Valérie Ratheau

Étude du traitement de sols contaminés aux hydrocarbures par l'addition de boues biologiques d'une raffinerie de pétrole

Mémoire

Présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès Science (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation :

Jean-Guy Bisaillon

François Lépine

Réjean Beaudet

Denis Rho

Juin 2000

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES II

LISTE DES TABLEAUX V

LISTES DES FIGURES VII

LISTE DES ABRÉVIATIONS IX

SOMMAIRE XI

INTRODUCTION 1

REVUE DE LITTÉRATURE 6

1. LES SOLS CONTAMINÉS 7
    1.1 Généralités 7
    1.2 Importance de la contamination 7
2. LES HYDROCARBURES 8
    2.1 Composition 8
    2.2. Les hydrocarbures aromatiques 9
        2.2.1 Structure chimique et propriétés 9
        2.2.2 Les sources 11
        2.2.3 Biodégradation 13
        2.2.4 Toxicité 13
    2.3 Les alcanes 14
        2.3.1 Propriétés 14
        2.3.2 Les sources 14
        2.3.3 Biodégradation 15
3. LES NORMES DU GOUVERNEMENT DU QUÉBEC 15
    3.1 Les contaminants cibles 15
    3.2 Les critères indicatifs 16
4. VOIES DE DÉGRADATION 18
    4.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques 18
    4.2 Alcanes 23
5. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DE SOLS CONTAMINÉS 27
    5.1 Traitements ex-situ 28
    5.2 Traitements in-situ 30
6. AMÉLIORATION DE LA DÉGRADATION 31
    6.1 Température 31
    6.2 Oxygène 32
    6.3 Nutriments 33
    6.4 Microorganismes 34
    6.5 Biodisponibilité 35
    6.6 pH 36
7. LES BOUES BIOLOGIQUES 37
    7.1 Types de boues biologiques 37

7.2 Composition 37
7.3 Transformation 41
7.4 Valorisation 42
7.5 Règles et risques de l'épandage de boues biologiques. 43
8. VALORISATION DES BOUES INDUSTRIELLES 46
8.1 Boues biologiques industrielles 46
8.2 Devenir des boues biologiques industrielles 47
8.3 Exemples de valorisation 47
MATÉRIEL ET MÉTHODES 52
1. SOLS 53
1.1 De la sablière Thouin 53
1.1.1 Échantillonnage et conservation du sol 53
1.1.2 Caractérisation microbienne 53
1.1.2.1 Dénombrement des bactéries totales 53
1.1.2.2 Dénombrement des bactéries dégradant les HAP 54
1.1.2.3 Dénombrement des bactéries dégradant les alcanes 56
1.2 Sol contaminé au créosote 56
2. BOUES BIOLOGIQUES DE LA RAFFINERIE DE PÉTROLE 56
2.1 Échantillonnage et conservation des boues 56
2.2 Caractérisation chimique 57
2.3 Caractérisation microbienne 57
2.3.1 Dénombrement des bactéries totales 57
2.3.2 Dénombrement des bactéries dégradant les HAP 57
2.3.3 Dénombrement des bactéries dégradant les alcanes. 57
3. CULTURES EN MICROCOSMES 58
3.1 Conditions de culture 58
3.2 Azote et microorganismes des boues 58
3.3 Microflore du sol 59
4. CONCENTRATION DES POLLUANTS DANS LES MICROCOSMES 60
4.1 HAP et alcanes 60
4.1.1 Extraction et analyses 60
4.1.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse 61
4.2 Hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} 64
5. SUIVI DES POPULATIONS BACTÉRIENNES 64
5.1 Milieux solides 64
5.2 Milieu liquide 65
5.3 Par PCR 65
5.3.1 Extraction de l'ADN génomique 65
5.3.2 Quantification de l'ADN 67
5.3.3 Amplification par PCR 67
6. MINÉRALISATION 68
RÉSULTATS 70
1. ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DES HYDROCARBURES 71
1.1 Dégradation des HAP et alcanes 71
1.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} 78
1.3 Minéralisation 79

1.3.1 Phénanthrène 79
1.3.2 Hexadécane 79
2. FACTEUR PROVENANT DES BOUES STIMULANT LA DÉGRADATION DES HYDROCARBURES 81
2.1 Azote 81
2.1.1 Dégradation des HAP et des alcanes 81
2.1.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} 83
2.1.3 Minéralisation 85
2.2 Microorganismes 85
2.2.1 Dégradation des HAP et alcanes 85
2.2.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} 86
2.2.3 Minéralisation 88
2.2.4 Microcosme avec un sol irradié 88
3. LA FLORE MICROBIENNE 91
3.1 Dénombrement microbien 91
3.1.1 Phénanthrène 91
3.1.2 Hexadécane 93
3.1.3 PCR 93
3.2 Suivi de la croissance microbienne en fonction du temps 94
3.2.1 Sur différents milieux solides 94
3.2.2 Milieux liquides 99
3.2.3 PCR 99
4. AUTRES SOLS 101
4.1 Microcosmes avec un sol plus contaminé 101
4.2 Microcosmes avec un sol contaminé au créosote 103
DISCUSSION 105
1. AVANTAGES DE L'ADDITION DES BOUES BIOLOGIQUES À UN SOL CONTAMINÉ AUX HYDROCARBURES 106
2. PRINCIPAUX FACTEURS DE L'AMÉLIORATION DE LA DÉGRADATION DES HYDROCARBURES 107
2.1 Analyse des performances de la dégradation 107
2.2 Microorganismes 109
2.3 Minéralisation 111
2.4 Analyse de la microflore 113
2.5 Comparaison avec la littérature scientifique 114
3. AUTRES SOLS 115
CONCLUSION 117
BIBLIOGRAPHIE 120
REMERCIEMENTS: 142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Liste des activités industrielles associées à la production, la transformation, l'utilisation et l'entreposage de matériaux contenant des HAP.	12
Tableau 2 :	Critères indicatifs de la contamination des sols pour les HAP.	17
Tableau 3 :	Caractéristiques chimiques des boues biologiques avant filtre-presse provenant du système de traitement des eaux usées d'une raffinerie.	38
Tableau 4 :	Caractéristiques physiques et chimiques de diverses boues biologiques.	39
Tableau 5 :	Caractéristiques physiques et chimiques de boues biologiques.	40
Tableau 6 :	Les différentes utilisations des boues biologiques en pourcentage.	44
Tableau 7 :	Statistiques liées à la valorisation agricole des boues biologiques municipales.	44
Tableau 8 :	Caractéristiques chimiques d'un échantillon du sol prélevé de la sablière Thouin.	51
Tableau 9 :	Conditions chromatographiques du CG/SM pour les analyses des hydrocarbures.	63
Tableau 10 :	Concentrations des hydrocarbures aromatiques en fonction du temps d'incubation dans les microcosmes effectués avec le sol de la sablière Thouin en présence ou non de boues biologiques.	74 75
Tableau 11 :	Concentrations des alcanes en fonction du temps d'incubation dans les microcosmes effectués avec le sol de la sablière Thouin en présence ou non de boues biologiques.	76
Tableau 12 :	Concentrations des HAP normalisés par le MEF en fonction du temps d'incubation dans des microcosmes avec boues biologiques.	77

Tableau 13 :	Concentrations des microorganismes du sol et des boues biologiques dégradant les HAP et les alcanes.	92
Tableau 14 :	Coloration Gram des souches du sol de la sablière Thouin et des boues biologiques retrouvées dans les cultures en présence de phénanthrène ou d'hexadécane.	92
Tableau 15 :	Formation de halos par diverses souches isolées à partir des microcosmes avec ou sans boues.	100

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Structure moléculaire de certains HAP et leur solubilité et leur récalcitrance.	10
Figure 2 :	Voies de dégradation des HAP par les champignons et les algues, la pourriture blanche, les bactéries et les algues.	19
Figure 3:	Les premières étapes de la voie métabolique du naphthalène et les gènes impliqués au niveau des diverses étapes.	21
Figure 4:	La voie métabolique du phénanthrène par les bactéries.	22
Figure 5:	Organisation et régulation des gènes cataboliques du naphthalène.	24
Figure 6 :	Les trois voies de dégradation des alcanes.	26
Figure 7 :	Concentration résiduelle des HAP et des alcanes dans les microcosmes biotique ou abiotique additionnées ou non de boues biologiques.	72
Figure 8 :	Pourcentage de CO_2 radioactif formé dans des microcosmes avec ou sans boues et leur contrôle abiotique approprié en présence de phénanthrène et hexadécane marqué.	80
Figure 9 :	Effet de l'ajout d'azote aux microcosmes sur la dégradation des alcanes et des HAP après 15 jours d'incubation.	82
Figure 10 :	Concentration résiduelle des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par de l'urée ou du nitrate d'ammonium en fonction du temps d'incubation.	84
Figure 11 :	Pourcentage de CO_2 radioactif formé dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par de l'azote en fonction du temps d'incubation en présence de phénanthrène marqué.	84

Figure12 :	Effet de l'ajout de boues autoclavées ou filtrat de boues sur la dégradation des alcanes et des HAP après 15 jours d'incubation.	87
Figure 13 :	Concentration résiduelle des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par du filtrat de boues ou des boues autoclavées en fonction du temps d'incubation.	89
Figure 14 :	Pourcentage de CO_2 radioactif formé dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par des boues stérilisées en fonction du temps d'incubation en présence de phénanthrène marqué.	89
Figure 15 :	Dégradation des HAP et des alcanes en fonction du temps d'incubation dans des microcosmes avec boues contenant du sol irradié et dans des microcosmes avec boues et un sol non irradié.	90
Figure 16 :	Suivi de la croissance microbienne des microcosmes avec ou sans boues sur milieu TSA additionné d'indole et sur milieu BHEL 0,05% sur lesquels du phénanthrène a été vaporisé en fonction du temps d'incubation.	95
Figure 17 :	Suivi de la croissance microbienne des microcosmes avec ou sans boues sur milieu PCA et sur milieu R2A sur lesquels du phénanthrène a été vaporisé en fonction du temps d'incubation.	98
Figure 18 :	Dégradation des HAP et des alcanes en fonction du temps d'incubation dans les microcosmes sans ou avec boues contenant un sol plus contaminé et dans des microcosmes avec boues contenant un sol peu contaminé.	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	: Acide déoxyribonucléotide
AMPA	: Acide aminométhylphosphonique
AQTE	: Association Québécoise des Techniques des Eaux
BH	: Milieu Bushnell Haas
BHEL	: Milieu Bushnell Haas supplémenté de 0,05 % d'extrait de levures.
BPC	: Biphényles chlorés
BTEX	: Benzène, Éthylbenzène, Toluène et Xylène
dpm	: comptes par minute
EDTA	: Acide éthylènediaminetétraacétique
EL	: Extrait de levures
EPA	: *U.S. Environmental Protection Agency*
HAM	: Hydrocarbure aromatique monocyclique
HAP	: Hydrocarbure aromatique polycyclique
HCB	: Hexachlorobenzène
MEF	: Ministère de l'Environnement et de la Faune
PBS	: Tampon phosphate salin
PCA	: *Plate count agar*
PCP	: Pentachlorophénol
PCR	: *Polymerase chain reaction*
PIA	: N-phosphométhylliminodiacétique
ppm	: partie par million

PVPP	: Polyvinylpolypyrolidone
sp.	: espèce
TSA	: *Tryptic Soy Agar*
UFC	: Unité formatrice de colonies

Sommaire

Les boues biologiques provenant du traitement des eaux usées d'une raffinerie de pétrole peuvent être utilisées comme source de nutriments et de microorganismes pour améliorer le biotraitement d'un sable contaminé aux hydrocarbures (HAP, alcanes et hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}) . Cette étude a été effectuée à l'échelle du laboratoire à l'aide de microcosmes contenant 50 g de sol contaminé provenant de la sablière Thouin. Après 15 jours d'incubation à la température de la pièce, une diminution plus importante de la concentration des alcanes et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) a été observée dans les microcosmes ayant reçu 0,7 % (p/p) de boues (93 % et 77 %, respectivement) par rapport à ceux avec de l'eau (22 % et 49 %, respectivement). La minéralisation du ^{14}C-phénanthrène et de ^{14}C-hexadécane a été observée seulement dans les microcosmes additionnés de boues biologiques. Pour déterminer si l'azote des boues est un facteur stimulant, celles-ci ont été remplacées par de l'urée ou du nitrate d'ammonium. Dans ces microcosmes, une diminution semblable à celle obtenue dans les microcosmes avec boues a été observée pour les HAP mais non pour les alcanes. L'azote contenu dans les boues jouerait un rôle majeur dans la dégradation des HAP mais non pour les alcanes. La stérilisation des boues a montré l'importante de la microflore de celles-ci dans la dégradation des alcanes et avait un rôle mineur dans la dégradation des HAP. Les comptes totaux de bactéries effectués sur le sol et les boues biologiques ont montré que la microflore est plus importante au niveau des boues que dans le sol. Par contre, le sol possède une plus forte concentration de bactéries dégradant les HAP, tandis que la microflore des boues était plus spécialisée dans la dégradation des alcanes. Ces recherches confirment que la valorisation des boues biologiques est possible dans la perspective d'une éventuelle amélioration du biotraitement de sols contaminés aux hydrocarbures.

INTRODUCTION

La recrudescence de la contamination de l'environnement par les produits organiques est principalement due à une augmentation de leur fabrication et leur utilisation par les industries. De plus, la diversité, le nombre et la complexité de ces composés ne cessent de s'accroître. La contamination des sols par ces produits chimiques récalcitrants occasionne une détérioration de notre environnement. Pour le protéger et préserver la santé humaine, le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec (MEF) ainsi que l'«Environmental Protection Agency» des États-Unis ont émis des normes concernant la concentration de plusieurs contaminants retrouvés au niveau des sols. Ces polluants peuvent être introduits dans l'environnement par des sources humaines ou des sources naturelles.

Les hydrocarbures sont parmi les contaminants les plus fréquemment retrouvés au niveau des sols (Anonyme, 1988). Parmi les différentes composantes des hydrocarbures, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont particulièrement préoccupants. À cause de leur hydrophobicité, ces composés ont tendance à s'associer aux sédiments et à persister dans l'environnement (Leahy et Colwell, 1990; Cerniglia, 1984). Les HAP possédant plusieurs cycles aromatiques sont les plus inquiétants, compte tenu de leur génotoxicité qui peut provoquer des dommages chromosomiques et des échanges entre chromosomes d'ADN sœurs (Cerniglia, 1984). Ce phénomène s'accroît avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques.

Le MEF, en 1991, répertoriait 346 sites d'élimination de déchets dangereux au Québec (Samson 1994a et b). En 1993, le nombre de terrains contaminés se situait à 800. Plus précisément, la contamination des sols par les hydrocarbures serait en partie due aux fuites du tiers des 50 000 réservoirs d'essence enfouis (Samson 1994a et b). En 1997, 112 sites excéderaient le critère B du MEF (concentration supérieure 0,1 ppm) en ce qui a concerne la contamination par les HAP (Anonyme, 1997). Ce genre de fuite serait aussi responsables de la contamination des sols par les hydrocarbures aux États-Unis. Il est estimé que plus de 10% des 3,5 millions de réservoirs de pétrole ont des problèmes

d'étanchéité. Des études ont démontré que ces fuites avaient occasionné aux alentours de 300 000 accidents de contamination de sols (Zhou et Crawford, 1995).

Une autre cause de contamination est l'enfouissement de déchets industriels. Parmi ceux-ci, il y a les boues d'épuration des eaux usées, qui contiennent une grande variété de composés organiques, polluants ou non, à des concentrations diverses. Approximativement 1 et 7 millions de tonnes de ces boues sont produites par an respectivement au Royaume Unis et aux États-Unis (Beck *et al.*, 1996). Les principaux moyens pour se débarrasser de ces déchets sont l'incinération, l'enfouissement et le déversement au large des côtes (Brown *et al.*, 1985). Plusieurs pays, comme les États-Unis, la France, le Danemark et la Suisse recyclent un faible pourcentage de leur production, en les étendant sur des terres agricoles. Malgré le fait que la concentration de certains composés organiques dans ces sols peut être augmentée, selon la fréquence des applications (Vecchioli *et al.*, 1997), les terres peuvent en retirer certains bénéfices (Beck *et al.*, 1996). Par exemple, les qualités physico-chimiques et biologiques peuvent être améliorées.

Une des techniques de décontamination économique et avantageuse de ces sols est le biotraitement. Celle-ci consiste en l'élimination de polluants de l'écosystème par l'utilisation de microorganismes qui transforment ou utilisent les composés chimiques comme source de carbone et d'énergie. Plus précisément, les microorganismes indigènes sont stimulés à dégrader les produits xénobiotiques ou bien des microorganismes déjà adaptés à la dégradation de ces composés sont introduits dans le sol. De nombreux microorganismes sont reconnus comme ayant cette capacité de dégradation (Young et Cerniglia, 1995). L'avantage de ce procédé est d'éliminer des contaminants, soit en les transformant en composés moins toxiques, soit en les minéralisant complètement.

Le désavantage des traitements biologiques réside dans le fait que ceux-ci éliminent surtout les composés organiques de poids moléculaire peu élevé. De récentes recherches ont montré que *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* sont capables d'utiliser le chrysène et d'autres HAP à quatre noyaux aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie (Caldini *et al.*, 1995). De plus, *Mycobacterium* sp. possède la capacité de minéraliser le fluorène (3 cycles), le naphthalène (2 cycles) et le pyrène (4 cycles) en cultures pures (Kelley et Cerniglia, 1991; Kelley *et al.*, 1990; Heitkamp *et al.*, 1988a et b) et le fluorène et le pyrène contenus dans des sédiments (Kelley et Cerniglia, 1991).

Des travaux antérieurs effectués dans notre laboratoire ont démontré que l'ajout de boues biologiques a permis d'augmenter la dégradation de certains HAP du sol de la sablière Thouin. Ces boues avant filtre-presse provenaient d'une usine de traitement d'eaux usées d'une raffinerie de pétrole. En absence de boues biologiques, la dégradation des HAP ne dépassait pas les 10 %, tandis que l'enlèvement a été de l'ordre de 50 % en présence de boues, après une période de 30 jours d'incubation (Bisaillon *et al.*, 1998).

Dans ce projet, nous avons étudié l'effet de l'ajout d'une source d'azote et d'une biaugmentation sur la dégradation des hydrocarbures contenus dans un sol. L'originalité de ce traitement provient du fait que l'on ajoute un déchet industriel, boues biologiques, pour décontaminer un sol. Les boues sont plutôt appliquées à des terres agricoles. Les travaux de recherche présentés dans le présent ouvrage ont pour objectif principal de déterminer si l'azote et les microorganismes des boues biologiques sont les éléments importants dans l'accélération de la dégradation des hydrocarbures contaminant un sol.

Le sol de la sablière Thouin contaminé aux hydrocarbures a été choisi pour évaluer l'efficacité du biotraitement. L'étude a été effectuée à l'échelle du laboratoire à l'aide de cultures en microcosmes consistés d'une phase solide (sable) qui était sursaturée par une phase liquide (eau ou boues biologiques). Contrairement aux boues, le sol est

déficient en azote. Une autre composante majeure des boues biologiques est la présence de microorganismes pré-adaptés à la dégradation des hydrocarbures puisqu'ils sont les principaux acteurs lors de la décontamination des eaux usées de la raffinerie de pétrole.

Un autre objectif est d'évaluer les diverses populations bactériennes des boues biologiques et du sol ainsi que les populations capables de dégrader le phénanthrène et l'hexadécane, qui sont de bons modèles de polluants à étudier. Un suivi des différentes populations bactériennes dans les microcosmes en présence ou non de boues, en fonction du temps, sera effectué grâce à des analyses sur milieux de culture et à l'aide du PCR.

Des comparaisons seront effectuées avec un sol irradié afin de mieux comprendre le rôle de la microflore indigène du sol. Un sable plus contaminé et un sol plus organique, contaminé au créosote, seront utilisés pour déterminer si le traitement peut être aussi efficace dans ces conditions. Des analyses des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} seront effectuées pour déterminer l'efficacité du biotraitement sur ces polluants.

Finalement, le dernier objectif est de montrer que le biotraitement avec les boues biologiques permet la dégradation complète des composés toxiques. Pour ce faire, du phénanthrène et de l'hexadécane radioactifs sont utilisés pour évaluer leur minéralisation. Le contaminant peut être dégradé en CO_2 et H_2O en conditions aérobies et en CH_4 et CO_2 en conditions anaérobies.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. LES SOLS CONTAMINÉS

1.1 Généralités

Le nombre, la diversité et la complexité des composés xénobiotiques produits de nos jours sont préoccupants. La forte utilisation de ces substances par les industries entraîne une détérioration de l'écosystème et de la santé publique car elles sont toxiques et ont tendance à s'accumuler dans l'environnement. L'omniprésence de ces composés a des conséquences graves sur tous les aspects de notre vie (Young et Cerniglia, 1995). De l'ensemble des 100 000 produits chimiques synthétisés commercialement, l'impact sur l'environnement et la santé humaine de seulement une centaine de ces composés est disponible. (Young et Cerniglia, 1995). La prise de conscience des problèmes engendrés par cette contamination de l'environnement a permis de faire progresser les procédés de restauration des sites pollués.

Les principales d'activités industrielles contribuant à cette pollution sont les secteurs de la pétrochimie, des plastiques, des pesticides, des peintures, des pâtes et papiers. L'intensification des activités humaines ne fait qu'accroître le problème. Plus d'une dizaine de milliers de composés chimiques ont été répertoriés sur divers sites pollués (Englande et Guarino, 1992). Parmi ceux-ci, des hydrocarbures, des composés phénolés, des métaux lourds, des pesticides, des hydrocarbures monocycliques volatils, et des hydrocarbures chlorés sont retrouvés (Samson, 1994a). La concentration de ces molécules dans l'environnement des pays industrialisés s'est accrue durant les dernières années à cause de l'augmentation des activités industrielles et de la population (Beck *et al.* 1996).

1.2 Importance de la contamination

Le groupe d'étude et de restauration des sols contaminés cataloguait, en mai 1993, 800 sites contaminés au Québec (Samson, 1994a). En 1994, le Ministère des Ressources Naturelles considérait que sur les 50 000 réservoirs enfouis au Québec 35 %, de ceux-ci laissaient s'écouler des hydrocarbures en raison de la corrosion. Des règlements au

niveau des produits pétroliers ont été adoptés pour prévenir l'étendue de cette contamination des sols. En 2001, tous les réservoirs souterrains en acier non protégés devront être changés. (Samson, 1994a). Le MEF a répertorié, en mai 1996, les sols contaminés retrouvés au Québec. Il y a présentement dans cette banque 1 870 sites contaminés, dont 112 par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) excédant le critère B, qui correspond à un seuil à partir duquel des analyses plus approfondies sont nécessaires. En 1993, le « U.S Environmental Protection Agency » (EPA) a estimé que 1,5 millions de réservoirs laissaient fuir des hydrocarbures aux États-Unis seulement. Sur approximativement 40 % de ces sites la contamination avait déjà atteint les sources d'eau. Entre 1,7 et 8,8 millions de tonnes métriques de pétrole sont annuellement déversées dans l'environnement par l'action humaine aux États-Unis (Leahy et Colwell, 1990), ce qui a pour conséquence d'accroître le potentiel de contamination de l'eau potable (Conrad *et al.*, 1997). Le nombre de sites contaminés est estimé à 100 000 au Canada (Calder *et al.*, 1997). Il en coûterait plus de 20 milliards de dollars pour décontaminer ces sites. Environ 15 % de ces contaminations seraient causées par les industries pétrolières.

2. LES HYDROCARBURES

2.1 Composition

Les hydrocarbures pétroliers comprennent plusieurs groupes de composés organiques dont un grand nombre persiste dans l'environnement. La complexité des hydrocarbures est dérivée du grand éventail de la taille moléculaire de ces composantes pouvant aller du simple méthane jusqu'au plus complexe des aromatiques polycycliques. En plus de leur taille, les hydrocarbures présentent une variété de structure moléculaire sous forme saturée ou non saturée, soit des chaînes linéaires ou ramifiées, soit des cycles simples ou combinés (Young et Cerniglia, 1995). Les hydrocarbures peuvent être classifiés en quatre groupes comprenant les aromatiques comme le phénanthrène, les aliphatiques (alcanes) comme l'hexadécane, les résines et les qui contiennent diverses fonctionnalités comme des acides gras, des amides, des acides carboxyliques, des pyridines et des sulfoxides (Leahy et Colwell, 1990). Cette revue de littérature s'intéressera seulement aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et aux

alcanes, car notre étude a porté sur le suivi de la dégradation de ces composés dans un sol contaminé par des résidus de pétrole.

2.2 Les hydrocarbures aromatiques

2.2.1 Structure chimique et propriétés

Les HAP sont des composés organiques comprenant deux à plusieurs noyaux aromatiques. De façon générale, les HAP contiennent de l'hydrogène et du carbone, mais occasionnellement un atome de carbone peut-être substitué par de l'azote ou du soufre. Certains HAP peuvent même avoir des substituants alkylés ou azotés. De plus, les noyaux aromatiques peuvent être positionnés de façon linéaire comme le naphtalène, en amas (pyrène) et en angle comme le benzo[a]anthracène. Finalement, le nombre de cycles permet de les classer en deux sous-groupes : les HAP légers (trois cycles et moins) comme l'anthracène et les HAP lourds (quatre cycles et plus) comme le pyrène (Figure 1) (Cerniglia, 1984).

Les HAP sont des composés hydrophobes. En général, plus le nombre de cycles augmente, moins les HAP sont solubles dans l'eau (Cerniglia, 1992). Ils ont donc tendance à s'adsorber rapidement à la matière organique du sol, en créant des liens hydrophobes non covalents. Cela entraîne leur persistance puisqu'ils sont alors moins disponibles pour les microorganismes et en l'occurrence moins biodégradables. De plus, 23-28 % de ces composés dans le sol ne sont pas disponibles pour les bactéries aérobies indigènes à cause d'une migration lente dans les profondeurs du sol (Beck *et al.*, 1996).

Les HAP légers, comme le naphtalène, sont connus comme possédant une demi-vie assez courte, contrairement aux HAP de haut poids moléculaire, comme le benzo[a]pyrène, qui sont considérés comme étant extrêmement récalcitrants et qui peuvent persister dans le sol pendant plusieurs années. Les microorganismes attaquent

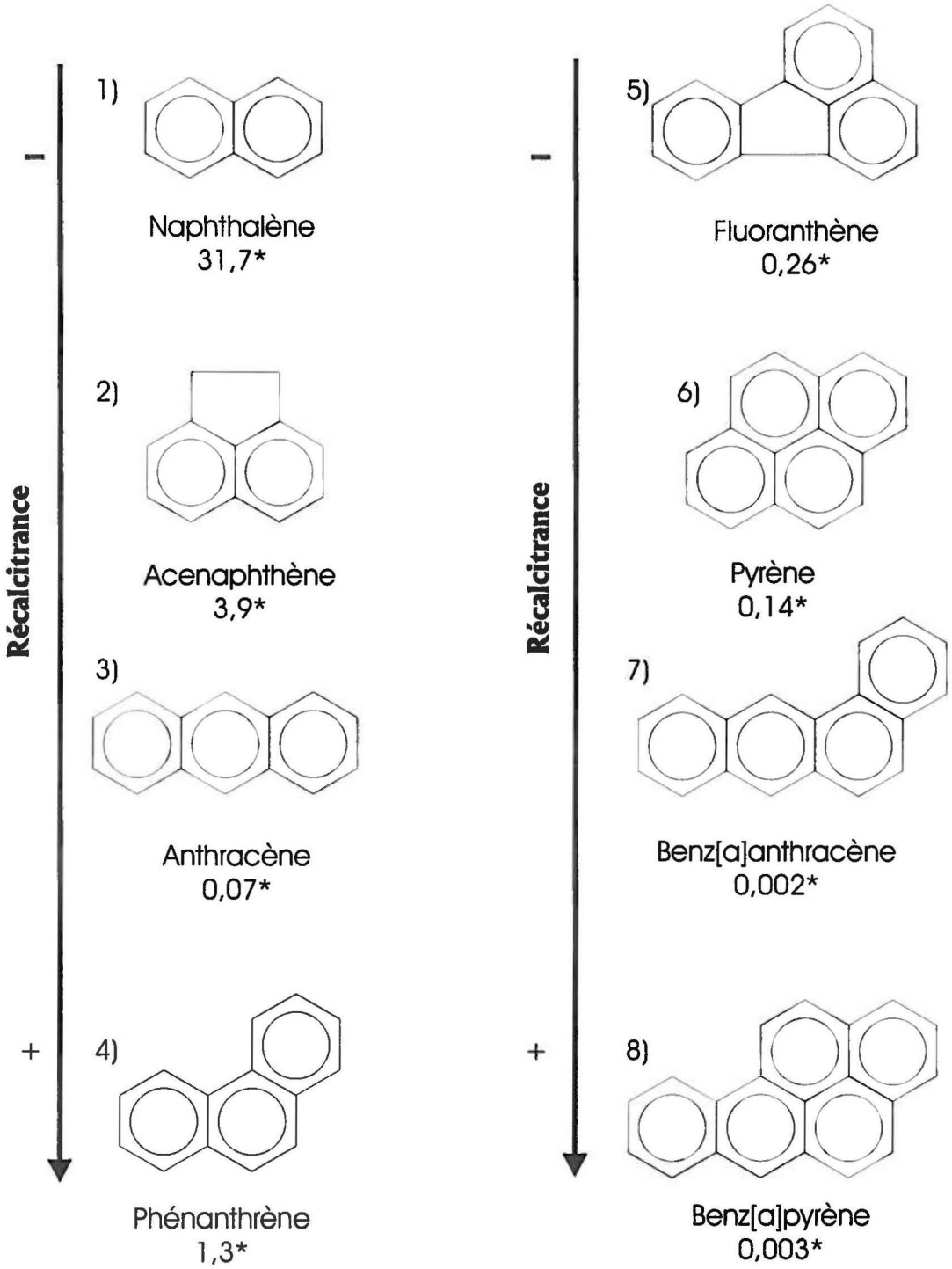


Figure 1: Structure moléculaire de certains HAP et leur solubilité (mg/L) (*)et leur récalcitrance (Cerniglia, 1993).

plus difficilement les composés de quatre à cinq cycles à cause de leur faible degré de solubilité (Grosser *et al.*,1991). Par conséquent, le nombre de cycles aromatiques et le poids moléculaire sont inversement proportionnels à la vitesse de dégradation des HAP. Le devenir des HAP dans l'environnement comprend la volatilisation, la photo-oxydation, l'oxydation chimique, la bioaccumulation, l'adsorption aux particules du sol et la transformation ou la dégradation de ceux-ci par des microorganismes.

2.2.2 Les sources

Les HAP sont des contaminants organiques formés par des processus pétrogéniques et pyrogéniques, conduisant entre autre à la production de pétrole brut, et par la suite peuvent être introduits de façon naturelle lors de suintements d'huile et de fuites d'huile (Mueller *et al.*, 1990; Mahaffey *et al.*, 1988; Cerniglia, 1984). Les divers arrangements moléculaires connus de ces composés sont produits par l'altération de la matière organique à des températures élevées qui peuvent être causées par des feux de forêt et de buissons.

Par contre, les HAP peuvent aussi être introduits dans l'environnement par diverses activités humaines telles que les procédés industriels et la cuisson ou la fumaison de la nourriture. Les voies de contamination par les HAP sont multiples : les retombées atmosphériques, les fuites industrielles, des déversements accidentels durant le transport, l'utilisation et l'entreposage de produits pétroliers. Plus particulièrement, les effluents industriels, l'incinération des déchets et du charbon et les dérivés des produits pétroliers libèrent de très fortes concentrations de HAP dans l'environnement. Pour une liste plus complète des sources de pollution par les HAP voir le Tableau 1 (Cerniglia, 1993; Wilson et Jones, 1993; Cerniglia, 1992; Leahy et Colwell, 1990).

Tableau 1 : Liste des activités industrielles associées à la production, la transformation, l'utilisation et l'entreposage de matériaux contenant des HAP (Cerniglia, 1992).

- La liquéfaction et gazéification de carburant fossile - La cokéfaction du charbon - La production et l'utilisation de l'asphalte - La distillation et le raffinement du pétrole brut - La production et l'utilisation de noir de carbone - Les procédés de traitement du bois. - Les préservatifs pour le bois - L'entreposage, le transport, les transformations, l'utilisation du mazout et de l'essence. - Les déversements de déchets - Les feux ouverts - L'incinération - Le fractionnement catalytique - La production et l'utilisation du goudron et de la braie de goudron

2.2.3 Biodégradation

La biodégradation des HAP de l'environnement dépend de leurs propriétés physique et chimique, de leur concentration et leur vitesse de diffusion dans le sol et l'eau et leur disponibilité pour les microorganismes. Mais les facteurs environnementaux, comme le type de sol, la disponibilité de l'oxygène et de l'eau, la présence de nutriments, l'activité microbienne, le pH, la température etc. (voir la section 6) sont aussi impliqués (Young et Cerniglia, 1995).

Les HAP sont plus difficilement dégradés que les alcanes vu la stabilité chimique de leur structure cyclique. Par contre, de nombreux microorganismes sont connus comme ayant la capacité à dégrader les HAP de faibles poids moléculaires comme le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène. On retrouve entre autre *Mycobacterium* sp., *Nocardia* sp., *Pseudomonas acidovorans, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida et Oscillatoria* sp. qui peuvent dégrader le naphthalène. *Beijerinckia* sp. peut utiliser l'acénaphthalène, l'anthracène et le phénanthrène. *Flavobacterium* sp. peut dégrader le phénanthrène comme peuvent le faire *Mycobacterium* sp., *Pseudomonas putida, Streptomyces flavovirens* et *Agmenellum quadruplicatum* (Young et Cerniglia, 1995). Nos connaissances sont restreintes au niveau du potentiel de dégradation des HAP lourds comme le chrysène et le benzo[a]pyrène. *Beijerinckia* sp. peut utiliser le benzo[a]anthracène et le benzo[a]pyrène. La dégradation du pyrène et du benzo[a]pyrène se fait par *Mycobacterium* sp. et *Selenastrum capricornutum*, respectivement.

2.2.4 Toxicité

La présence des HAP dans l'environnement est très inquiétante en raison de leur potentiel toxique, mutagène et cancérigène. Ce sont principalement les HAP de quatre cycles et plus qui peuvent avoir des effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine. De nombreuses études ont démontré que le contact de l'homme avec les HAP, serait un facteur important dans le développement de certains cancers (Santodonato, 1997; Guengerich, 1993; Hall et Grover, 1990; Mahaffey *et al.*, 1988; Kadlubar et

Hammons, 1987). Des indications claires que les HAP peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire ont amené l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (Beck *et al.*, 1996) et le gouvernement du Québec (Anonyme, 1988) à reconnaître 16 HAP comme étant des polluants prioritaires à surveiller dans les écosystèmes aquatiques et terrestres.

2.3 Les alcanes

2.3.1 Propriétés

Les hydrocarbures de la fraction saturée, composés qui ne possèdent pas de double liaisons entre les atomes de carbones, comprennent les *n*-alcanes, les alcanes branchés et les cycloalcanes (Atlas, 1981). Les *n*-alcanes sont constitués d'une longue chaîne de carbone pouvant aller jusqu'à plus de 40 atomes. De manière plus précise, la formule générale des alcanes saturés est C_nH_{2n+2}. Les cycloalcanes sont des alcanes dont un lien est formé entre les deux atomes de carbones de l'extrémité de la chaîne. Les alcanes possèdent un point d'ébulition qui tend à s'accroître avec le nombre de carbone présent dans la molécule. Par exemple, à la température de la pièce les alcanes de C_1 à C_4 sont sous forme de gaz, les C_5 à C_{17} sont liquides et les C_{18} et plus sont solides (Hart et Conia, 1991).

2.3.2 Les sources

La possibilité de retrouver des microorganismes pouvant dégrader les alcanes dépend de la disponibilité de ces composés dans la nature (van Beilen *et al.*, 1994). De grandes quantités d'alcanes sont produites à partir de matières organiques qui se sont accumulées avec le temps (van Beilen *et al.*, 1994). Une autre source d'accumulation d'hydrocarbures sont les plantes qui produisent de l'éthylène et de longues chaînes d'alcanes (Taylor et Calvin, 1987). Le même phénomène est aussi rencontré chez certains microorganismes qui ont la capacité de produire du méthane, de l'éthylène ainsi que probablement des alcanes (Bird et Lynch, 1974).

2.3.3 Biodégradation

La littérature dénombre plusieurs exemples de microorganismes environnementaux, en laboratoire ou sur le terrain, qui dégradent les alcanes (Oudot *et al.*, 1989; Kennicutt *et al.*, 1988). En général les alcanes sont plus rapidement dégradés par voie biologique que les autres composés du pétrole. Par contre, les alcanes ramifiés sont plus lentement dégradés en raison de leur structure moléculaire qui gène l'action des enzymes responsable de la dégradation (De Jonge *et al.*, 1997).

Le nombre d'atomes de carbones formant la chaîne linéaire des alcanes est un facteur très important qui affecte la vitesse d'oxydation et de métabolisation de ces composés. Les alcanes comprenant entre 10 et 18 carbones sont dégradés très rapidement, et supportent la croissance de plusieurs microorganismes. La dégradation des alcanes s'effectue lorsque ceux-ci sont solubilisés. Ce qui explique que l'on observe une réduction de la vitesse d'oxydation des alcanes à chaîne plus longue due à leur plus faible disponibilité pour les microorganismes. Même si la concentration des alcanes en général diminue, la concentration de ceux possédant une longue chaîne persiste. Ceci reflète bien la littérature car il est mentionné que plus la chaîne augmente plus la vitesse de dégradation diminue. Un phénomène important à noter, à l'inverse des HAP : plus la chaîne de carbone diminue, plus les alcanes sont solubles conséquemment toxiques (Inoue et Horikoshi, 1991; Laane *et al.*,1987). Les microorganismes sont quand même capables de les utiliser comme source de carbone, par exemple *Pseudomonas oleovorans* dégrade l'hexadécane (Baptist *et al.*, 1963). Haines et Alexander (1974) font mention de microorganismes pouvant dégrader des alcanes de 44 carbones.

3. LES NORMES DU GOUVERNEMENT DU QUÉBEC

3.1 Les contaminants cibles

Le MEF a établi des normes, en ce qui concerne la contamination des sols par des produits chimiques, pour réglementer leur utilisation afin de protéger la population. Ces normes visent les métaux lourds, les pesticides, les hydrocarbures pétroliers (C_{10} à C_{50}),

les polluants minéraux, les hydrocarbures chlorés, les HAP, les composés phénolés et les composés aromatiques monocycliques volatils. Il est important de mentionner que même si les alcanes se retrouvent dans la majorité des sites contaminés aux hydrocarbures, aucune norme les concerne directement. Les alcanes font partie du groupe des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}, qui est un paramètre pour évaluer la contamination d'un site par les hydrocarbures. Ceci pourrait expliquer que l'on ne mentionne jamais l'ampleur de leur pollution. Les différents polluants contrôlés par ces normes peuvent être soit analysés de façon individuelle, soit de façon globale.

3.2 Les critères indicatifs

Les normes du MEF sont en réalité des critères indicatifs. Les critères indicatifs de contamination sont divisés en trois valeurs seuils représentées par les lettres A, B et C. De plus le MEF a établi trois plages d'intervention qui sont les plages A-B, B-C et >C. Les HAP seront pris comme exemple pour exprimer ces différents critères (Tableau 2). Les concentrations retrouvées au niveau du seuil A sont les plus faibles et elles ne permettent qu'une contamination inférieure à 0,1 ppm. Tandis que les sols contaminés avec une concentration de 10 ppm de chrysène, de 50 ppm de phénanthrène ou de 100 ppm de pyrène, par exemple, sont considérés comme étant situés au niveau du seuil C.

En ce qui concerne la plage A-B, les concentrations de polluants retrouvés sur ces sites sont relativement faibles et permettent la construction résidentielle puisque des travaux de décontamination ne sont pas nécessaires. Par contre, les concentrations au niveau de la plage B-C sont plus élevées. Cependant, ces sites ne subiront des travaux de décontamination que si la nappe phréatique a des possibilités d'être affectée. Ces sites pourront être utilisés pour des constructions industrielles et commerciales. Finalement, la plage >C nécessite obligatoirement une décontamination du site avant toute construction car de plus fortes concentrations de polluants sont présentes.

Tableau 2 : Critères indicatifs de la contamination des sols pour les HAP (Anonyme, 1988).

HAP	Concentration mg/kg de matière sèche		
	A	B	C
Chrysène	<0,1	1	10
Benzo(a)anthracène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,h)anthracène	<0,1	1	10
3-méthylcholanthrène	<0,1	1	10
Benzo(b,j,k)fluoranthène	<0,1	1	10
Benzo(g,h,i)pérylène	<0,1	1	10
Benzo(c)phénanthrène	<0,1	1	10
Benzo(a)pyrène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,h)pyrène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,i)pyrène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,l)pyrène	<0,1	1	10
Indéno(1,2,3,c,d)pyrène	<0,1	1	10
Naphtalène	<0,1	5	50
Phénanthrène	<0,1	5	50
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
Pyrène	<0,1	10	100
Sommation des HAP	1	20	200

4. VOIES DE DÉGRADATION

4.1 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les connaissances sur la dégradation des HAP légers sont beaucoup plus complètes que celles sur la dégradation des HAP lourds. Trois voies métaboliques en conditions aérobies de dégradation des HAP sont connues et peuvent être effectuées soit par les eucaryotes, soit par les procaryotes (Figure 2) (Cerniglia, 1984). Certains microorganismes, comme les champignons, détoxifient les HAP par co-métabolisme, tandis que les bactéries et les champignons ligninolytiques ou non ligninolytiques oxydent les HAP en ouvrant les anneaux aromatiques et en les utilisant comme source de carbone.

Chez les bactéries, l'incorporation d'une molécule d'oxygène est toujours impliquée lors de l'hydroxylation des HAP. La première étape de la voie métabolique est effectuée grâce à une dioxygénase. Cette enzyme incorpore deux atomes d'oxygène au niveau du noyau aromatique pour former un *cis*-dihydrodiol (Gibson *et al.*, 1990). Par la suite, la déshydrogénase permet la réaromatisation du benzène pour ainsi produire des intermédiaires dihydroxylés comme le catéchol. Puis la voie se sépare en deux ce qui implique des dioxygénases plus spécifiques (Gibson et Subramanian, 1984). La première voie effectue une fission du cycle en position *ortho* et la seconde en position *méta*. De l'acide *cis-cis* muconique et 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde seront respectivement formés. Ces composés seront par la suite oxydés de façon similaire à la voie de dégradation des hydrocarbures aliphatiques jusqu'à leur dégradation complète (Cerniglia, 1993). Les mêmes étapes décrites précédemment se produiront pour ouvrir les autres cycles du composé aromatique.

Les deux autres voies sont effectuées par des champignons ligninolytiques et non ligninolytiques. *Cunninghamella elegans* est un exemple du type de champignon non ligninolytique qui utilise le cytochrome P-450 monooxygénase. Cette enzyme permet l'incorporation au niveau du cycle aromatique d'un seul atome d'oxygène à la fois. Un

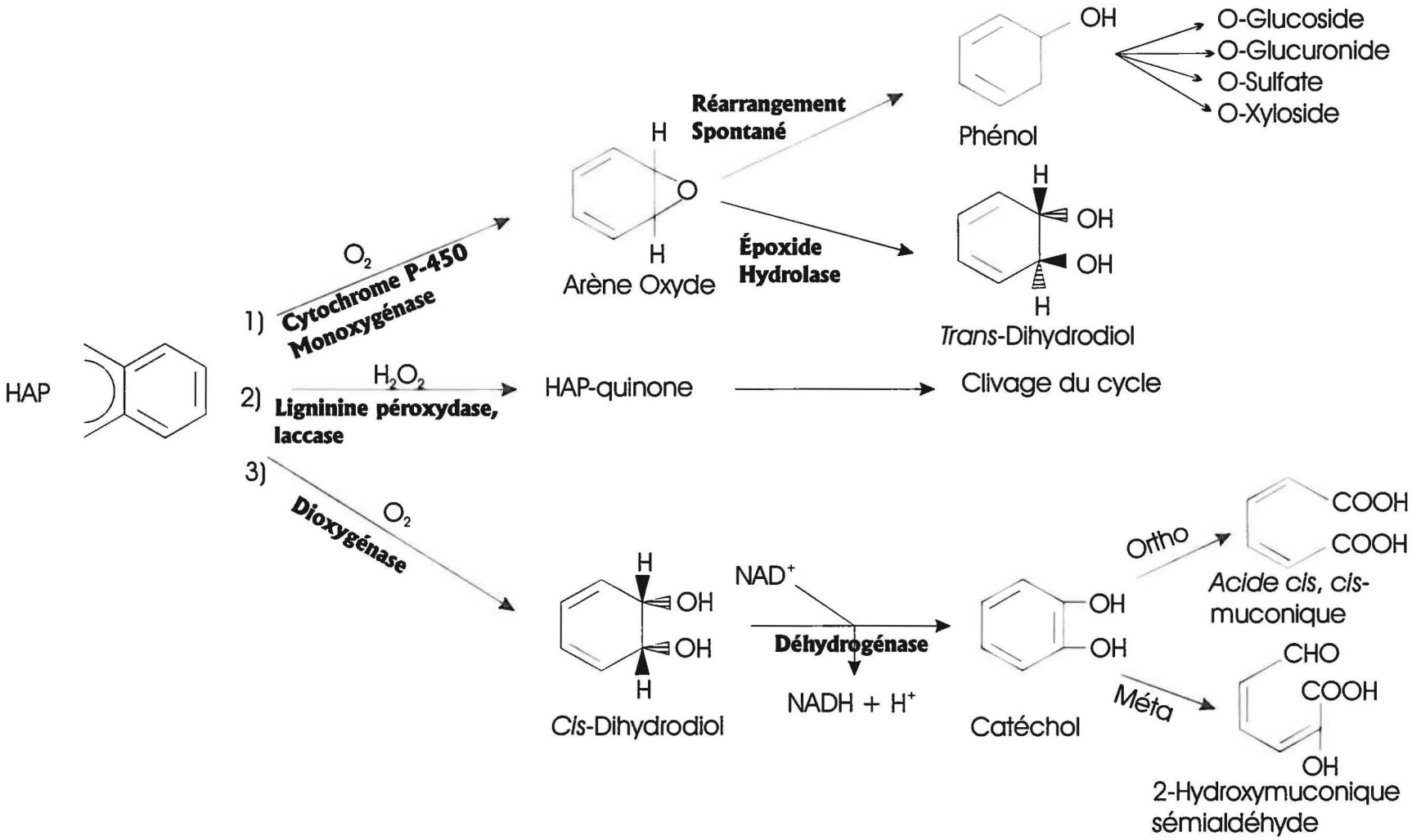


Figure 2: Voies de dégradation des HAP par les champignons et les algues (1), la pourriture blanche (2),les bactéries et les algues (3)(Cerniglia, 1993).

maximum de deux atomes d'oxygène sera incorporé. L'intermédiaire formé peut subir une transformation métabolique par une époxyde hydrolase pour produire un *trans*-dihydrodiol. Mais il peut aussi subir un réarrangement non enzymatique pour produire du phénol qui pourra être par la suite conjugué avec du sulfate, du glucose ou de l'acide gluconique (Cerniglia, 1993). Les champignons qui utilisent cette voie de dégradation ne peuvent, généralement, que rendre les composés moins toxiques par co-métabolisme et non les utiliser comme seule source de carbone. L'autre voie, utilisée par les champignons, oxyde les HAP par une lignine peroxydase qui peut effectuer son action à des positions différentes.

Au niveau des bactéries, plusieurs recherches ont été effectuées sur la voie métabolique de dégradation du naphtalène, un HAP à deux cycles (Figure 3). Plusieurs souches microbiennes métabolisent le naphtalène tel que *Pseudomonas* spp. (Eaton et Chapman, 1992; Utkin, 1990), *Acinetobacter calcoaceticus* (Ryu *et al.*, 1989), *Mycobacterium* sp. (Kelley *et al.*, 1990; Heitkamp *et al.*, 1988a et b) et *Rhodococcus* sp. (Grund *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1991). Il existe maintenant des données sur les voies de dégradation des HAP de plus de deux cycles ainsi que sur les microorganismes impliqués. Celles-ci incluent les HAP à trois cycles (anthracène, phénanthrène et fluoranthène) (Figure 4) (Menn *et al.*, 1993; Walter *et al.*, 1991; Weissenfels *et al.*, 1991,1990; Mueller *et al.*, 1990; Sutherland *et al.*, 1990) , à quatre cycles (pyrène et benzo[a]anthracène) (Boldrin *et al.*, 1993; Cerniglia 1992; Mahaffey *et al.*, 1988) et à cinq cycles (acénaphtalène et benzo[a]pyrène) (Komatsu *et al.*, 1993; Warshawsky *et al.*, 1990). Tous ces différents composés semblent subir les transformations mentionnées préalablement lors de la dégradation par les bactéries via le salicylate.

D'un point de vue moléculaire, les gènes impliqués dans la dégradation du naphtalène sont de façon générale localisés sur un plasmide transmissible, ADN extra-chromosomique, comme le sont aussi les gènes pour le toluène, le biphényle et le phénanthrène (Yen et Serdar, 1988; Cerniglia, 1984 ; Yen et Gunsalus, 1982). Le

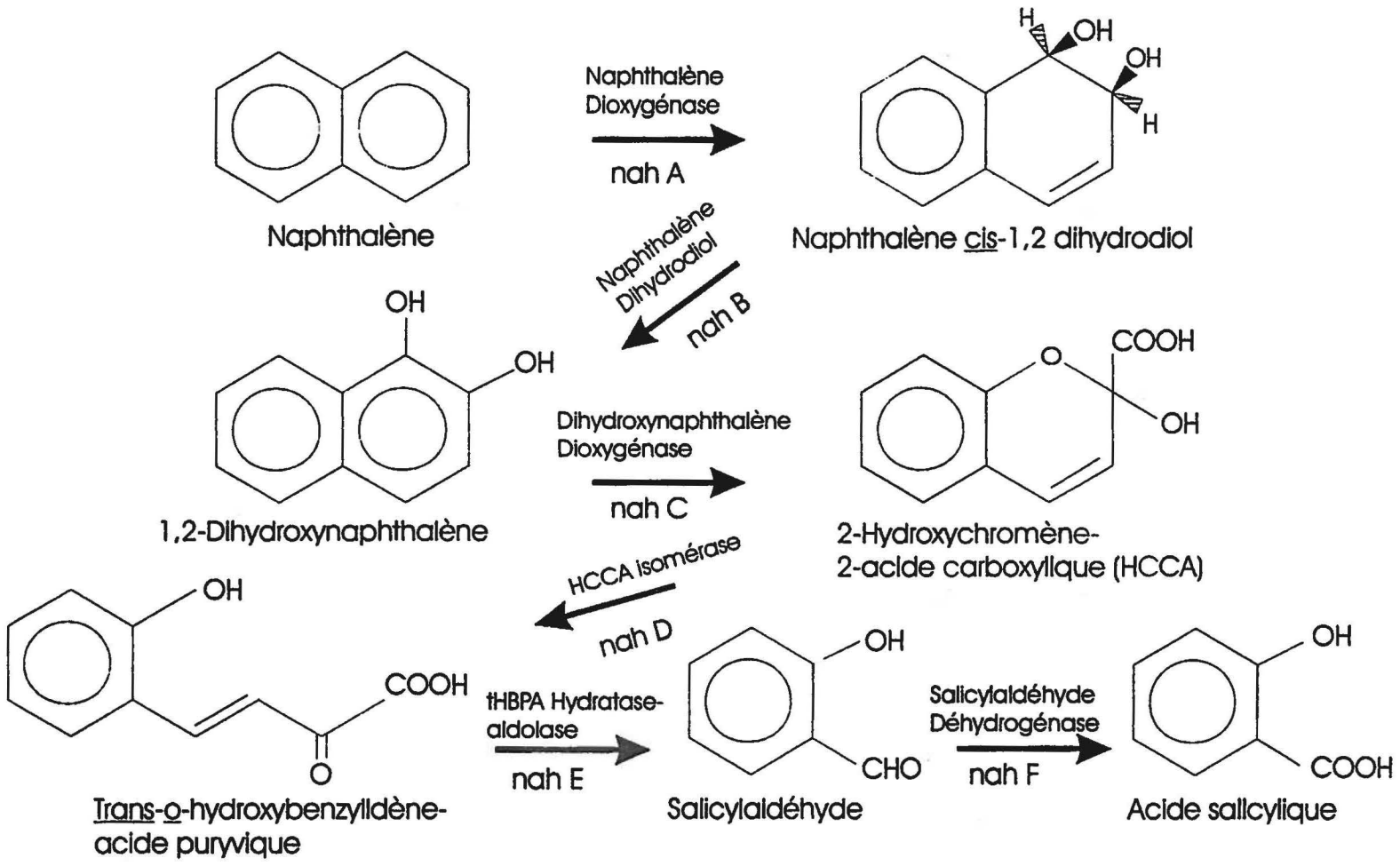


Figure 3 : Les premières étapes de la voie métabolique du naphthalène et les gènes impliqués au niveau des diverses étapes (Young et Cerniglia, 1995).

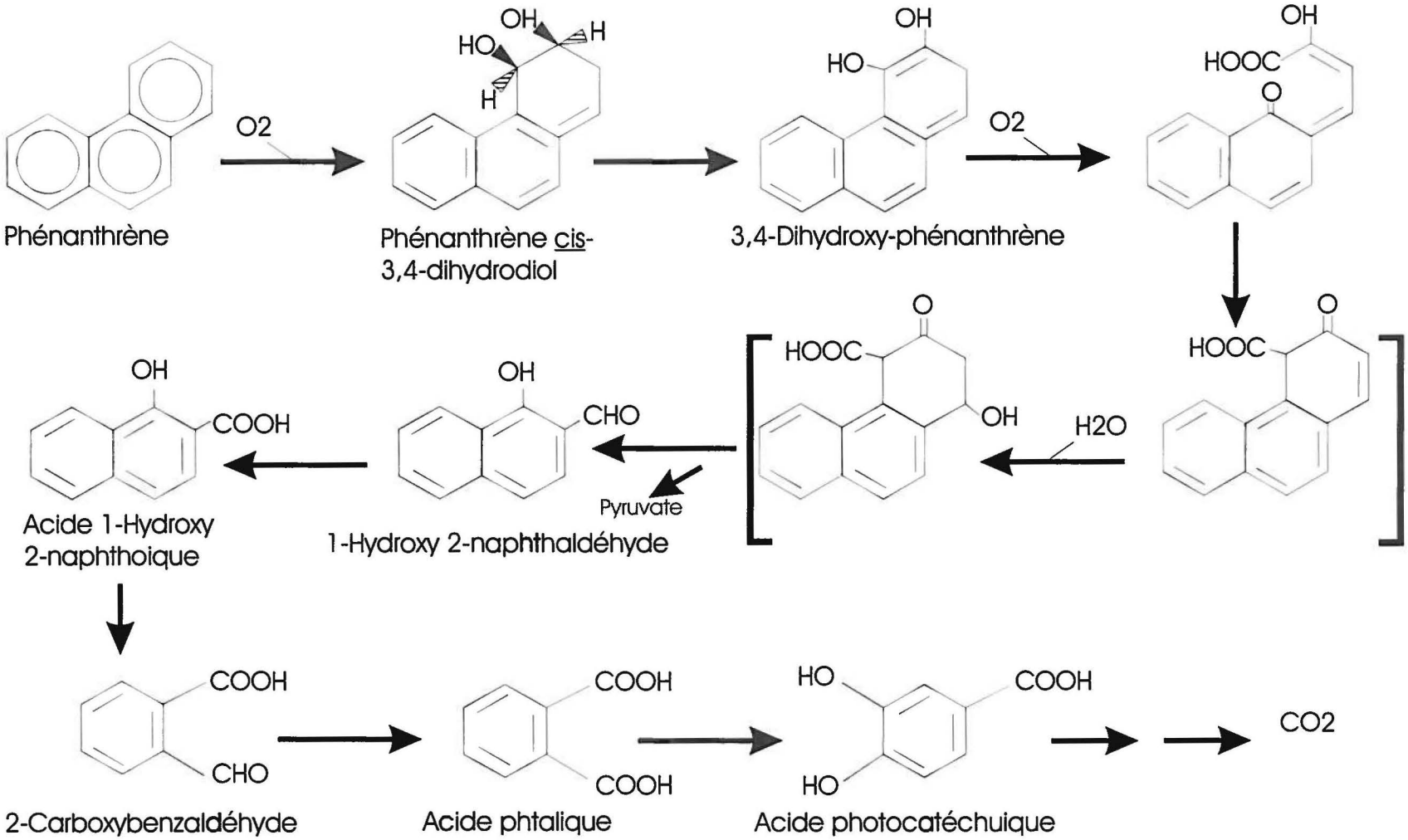


Figure 4: La voie métabolique du phénanthrène par les bactéries (Young et Cerniglia, 1995).

plasmide NAH7 possède deux opérons impliqués dans le métabolisme du naphtalène (Figure 5). Le premier, l'opéron *nah,* code pour les enzymes responsables de la voie métabolique supérieure. Cet opéron comprend les gènes *nah* A, B, F, C, E et D. Tandis que l'opéron *sal* code pour les enzymes de la voie métabolique inférieure. Cet opéron comprend les gènes *nah* G, H, I, N, L, J et K. Les gènes N et L sont des gènes régulateurs (Schell, 1986). Plus précisément, l'opéron *nah* est impliqué dans le métabolisme du naphtalène jusqu'au catéchol. Certaines souches de *Pseudomonas* spp. isolées de l'environnement ont démontré leur aptitude à dégrader les alcanes (C5-C12) et le naphtalène. Ces souches possèdent deux plasmides sur lesquels se trouvent les gènes responsables de la voie de dégradation soit du naphtalène, soit des alcanes (Whyte *et al.*, 1997).

Divers groupes de champignons ligninolytiques ou non ligninolytiques peuvent oxyder les HAP. Contrairement aux bactéries, les enzymes des champignons ne sont pas spécifiques. *Cunninghamella elegans* a démontré des capacités à métaboliser des HAP tels que le phénanthrène et le benzo[a]pyrène (Cerniglia *et al.*, 1992; Pothuluri *et al.*, 1992a et 1992b; Sutherland, 1992). En ce qui concerne les voies de dégradation, elles sont peu connues. De plus en plus de champignons sont isolés pour leur capacité à métaboliser des HAP de deux à cinq cycles et beaucoup d'informations sont accumulées sur les intermédiaires de dégradation. (Young et Cerniglia, 1995).

4.2 Alcanes

Les voies métaboliques utilisées par les microorganismes pour dégrader les alcanes sont similaires entre elles. Tout dépend de la position d'initiation de la dégradation (De Jonge *et al.*, 1997). La disponibilité des alcanes (C16-C20) à de fortes concentrations est contrôlée par le transfert de ces composés d'une phase non aqueuse à une phase aqueuse du sol (De Jonge *et al.*, 1997). Par contre, à de plus faibles concentrations, la diffusion et la désorption seraient les facteurs qui limitent la dégradation (De Jonge *et al.*, 1997).

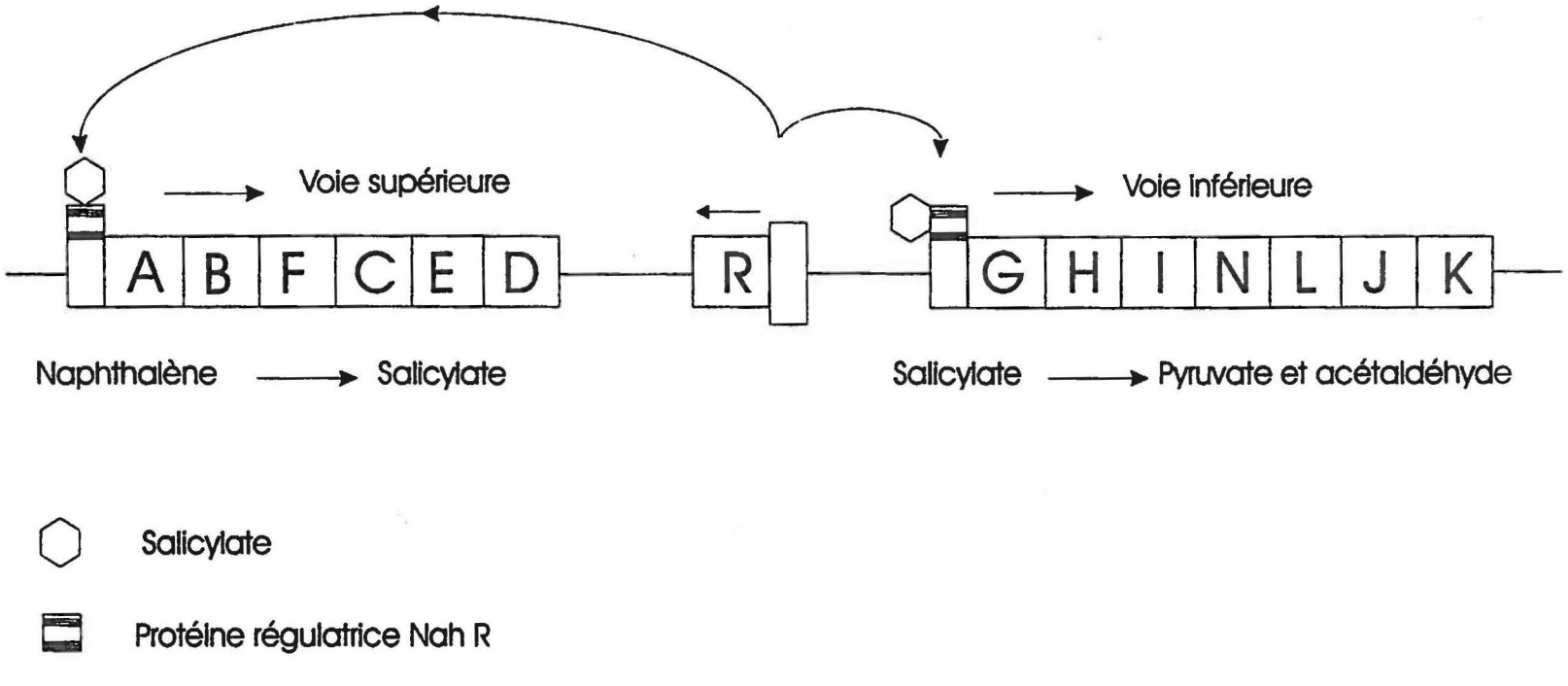


Figure 5: Organisation et régulation des gènes cataboliques du naphthalène (Young et Cerniglia, 1995).

La dégradation des alcanes peut être effectuée selon trois voies métaboliques (Figure 6). Ces voies d'oxydation sont effectuées par le système d'hydrolase d'alcanes, qui est constitué de trois composantes : une hydrolase et deux protéines solubles (une rubrédoxine et une réductase rubrédoxine) (van Beilen *et al.*, 1994). La première voie est l'oxydation monoterminale qui attaque l'alcane à l'une des extrémités (Maeng Ho *et al.*, 1996; Atlas, 1981). Cette voie est principalement effectuée par la souche de *Pseudomonas* spp. (May et Katoposis, 1990). Une première attaque se produira pour former un alcool. Cette molécule sera par la suite transformée en un aldéhyde et un acide monocarboxylique. Puis, l'acide carboxylique sera β-oxydé pour former un acide gras plus court de deux carbones, de l'acétyle coenzyme A, et dans certains cas du dioxyde de carbone. King et Perry (1975) et Atlas et Bartha (1973) ont observé l'accumulation de ces composés lors de la dégradation des hydrocarbures. Certains acides gras produits sont reconnus comme étant toxiques (King et Perry, 1975; Atlas et Bartha, 1973).

La seconde est la voie de l'oxydation biterminale qui attaque les alcanes en hydroxylant les groupements méthyles aux deux extrémités à la fois. Cette voie est retrouvée au niveau de diverses souches bactériennes et de champignons (Rehm et Reiff, 1981). Finalement, la dernière est la voie de l'oxydation subterminale qui est principalement représentée par la souche *Nocardia* spp (Markovetk, 1981). Cette voie passe par la formation d'un alcool secondaire et ensuite d'une cétone. Mais celle-ci n'est pas la voie métabolique principale employée par les microorganismes dégradant les alcanes.

La voie de dégradation biterminale est utilisée dans le cas des alcanes hautement ramifiés, comme le pristane. Dans ce cas-ci, il y a formation de l'acide dicarboxylique comme intermédiaire majeur (Pirnik, 1977). Pour leur part, les alcanes ramifiés avec un groupement méthyle et les cyclohexanes font partie des composantes des hydrocarbures qui sont résistantes à la dégradation. L'hopane, qui est un cyclohexane, est un des composés le plus persistant lors de déversement de pétrole (Atlas et al., 1981). La

Figure 6 : Les trois voies de dégradation des alcanes (Maeng Ho *et al*, 1996).

1- La voie d'oxydation monoterminale :

$$RCH_3 \longrightarrow RCH_2OH \longrightarrow RCHO \longrightarrow RCOOH$$

2- La voie d'oxydation biterminale :

$$H_3CRCH_3 \longrightarrow H_3CRCH_2OH \longrightarrow HOCH_2RCH_2OH \longrightarrow HOOCRCOOH$$

3- La voie d'oxydation subterminale :

$$RCH_2CH_3 \longrightarrow RCH(OH)CH_3 \longrightarrow RC(O)CH_3$$

voie de dégradation implique une oxydation qui sera suivie par l'ouverture du cycle. Il est reconnu que les cyclohexanes substitués sont plus facilement dégradés que ceux qui ne le sont pas (Pirnik *et al.*, 1974).

Plusieurs *Pseudomonas* ont démontré leur capacité à utiliser des alcanes comme seule source de carbone et d'énergie. Les gènes et les enzymes impliqués dans la dégradation des alcanes ont été étudiés au niveau de *Pseudomonas oleovorans* qui oxyde les *n*-alcanes de C5 à C12. Il semblerait que deux régions de gènes localisées sur le plasmide transmissible OCT seraient impliquées dans le métabolisme des alcanes. Ces deux régions correspondent aux gènes *alk* B, F, G, H, J, K et L et *alk* S et T qui codent les protéines nécessaires pour la conversion des alcanes en leurs dérivés acyl-CoA. Ces composés peuvent par la suite entrer dans le cycle de la β-oxydation et être utilisés comme source de carbone et d'énergie (van Beilen *et al.*, 1994).

5. TRAITEMENTS BIOLOGIQUES DE SOLS CONTAMINÉS

Les procédés les plus employés présentement pour la décontamination de sites sont des traitements thermiques et physico-chimiques. Par contre, ils sont très coûteux et affectent l'environnement puisqu'ils ont tendance à diminuer la valeur fertilisante du sol. Le traitement biologique est une excellente alternative puisque les microorganismes peuvent transformer ou utiliser les contaminants comme source de carbone et d'énergie. Les contaminants organiques peuvent être dégradés par des organismes vivants. Parmi ces contaminants, il y a les HAP, les hydrocarbures aliphatiques et ramifiés, les BTEX (benzène, éthylbenzène, toluène et xylène), le PCP (pentachlorophénol), les BPC (biphényles chlorés) et les pesticides. Les conditions environnementales ainsi que de trop fortes concentrations de contaminants peuvent affecter les capacités des microorganismes à dégrader ces molécules.

Les avantages de cette technologie sont : le faible coût de mise en œuvre, la simplicité de son utilisation et la préservation de l'intégrité du sol. Le traitement biologique peut être *in situ*, effectué directement sur le sol en place ou *ex situ* c'est à dire effectué après l'excavation du sol. Malgré les nombreux avantages du traitement biologique, les caractéristiques du sol telles que la composition et l'hydrogéologie doivent être prises en considération pour assurer la performance du traitement. Les objectifs du traitement sont de réduire la concentration des contaminants, de diminuer la toxicité des polluants et d'empêcher la migration de la contamination pour ainsi assurer la qualité de l'environnement et préserver la santé publique. Des conditions idéales sont mises en œuvre pour que le traitement biologique permette aux microorganismes d'effectuer adéquatement la dégradation des polluants. Certaines contraintes environnementales influencent le procédé dont la présence ou non de microorganismes dégradant les polluants d'intérêts, la disponibilité de ces polluants, le pH, les nutriments, la température, les accepteurs d'électrons et une quantité suffisante d'oxygène.

Cette approche biologique s'avère très intéressante au niveau économique pour décontaminer de grands volumes de sols ou de sédiments pollués ou bien pour diminuer les risques de contamination de la nappe phréatique. Comme la suite du présent projet a pour objet l'étude de la dégradation des HAP et des alcanes dans un sol excavé, les traitements *ex situ* seront traités plus en détail.

5.1 Traitements *ex-situ*

Le traitement *ex situ* peut s'effectuer à l'aide d'une biopile ou d'un réacteur. Le sol contaminé est excavé et certains paramètres sont améliorés selon le sol à traiter tels que les conditions nutritionnelles et la disponibilité des contaminants. Lorsque le type de sol traité par ce procédé est problématique, des éléments structuraux, comme des copeaux de bois, sont ajoutés pour améliorer les propriétés mécaniques du sol. Ceci entraîne une meilleure oxygénation. De plus, la dégradation peut être améliorée par l'ajout d'agents tensioactifs pour rendre plus disponible les polluants fortement adsorbés.

L'un des traitements *ex situ* est l'épandage contrôlé qui consiste à étendre des couches d'un mètre de sol contaminé sur une surface imperméable. La microflore indigène est par la suite stimulée en créant des conditions favorables à sa croissance (ajout de nutriments, contrôle du pH et de l'oxygène) (Samson, 1994b). Cette technologie est peu coûteuse et performante pour les hydrocarbures non volatils. Par contre, il est difficile de contrôler les émissions qui se dégagent du sol, car le procédé est inégal et les performances de ce traitement sont compliquées à prédire (Samson, 1994b).

Une autre technique consiste à former des biopiles avec le sol excavé. Ce sol contaminé est déposé sur une surface imperméable en forme de cuvette avec un drain de récupération des eaux de lixiviation (Samson, 1994b). Le tout est recouvert d'une membrane imperméable pour protéger des eaux de pluie. L'oxygénation de la biopile se fait par aspiration de l'air à l'aide d'un tuyau perforé enfoui sous la pile. Les nutriments ainsi que l'eau peuvent être ajoutés par arrosage. Ce traitement est efficace pour les sols sablonneux et contaminés par des huiles et graisses minérales; par contre il est beaucoup plus lent pour les sols argileux contaminés avec des hydrocarbures (Samson, 1994b). Il permet de mieux retenir les émissions que le procédé précédent. En plus de la biopile, un système de biofiltration peut être ajouté pour traiter les composés volatiles. Ces composés seront acheminés vers un biofiltre dans lequel se produira les réactions de dégradation. Le traitement en biopile avec biofiltre permet de dégrader en parallèle les hydrocarbures volatiles et lourds (Samson, 1994b).

Dans le traitement par bioréacteur de type « slurry », le sol est préalablement tamisé pour être par la suite ajouté dans plusieurs bassins à raison d'environ 30% (p/v) (Samson, 1994b). Dans le premier bassin sont ajoutés les nutriments, les bactéries et l'oxygène pour permettre la dégradation des composés disponibles. Dans le second, des agents tensioactifs sont incorporés pour libérer les polluants fortement adsorbés. Finalement, le dernier bassin permet de terminer la décontamination du sol en ajoutant des bactéries, des nutriments et de l'oxygène. Cette technologie permet l'accélération de

la vitesse de dégradation compte tenu de la disponibilité accrue des polluants et du contrôle des paramètres (Samson, 1994b).

Les bioréacteurs à sol statique traitent les sols contaminés en absence de phase liquide. Le procédé consiste à introduire le sol dans des bioréacteurs rotatifs et y ajouter des nutriments ainsi que des agents structuraux pour prévenir l'agglomération des particules (Samson, 1994b). L'humidité du sol est contrôlée, et des brassages occasionnels permettent d'augmenter la disponibilité des polluants.

La combinaison de divers traitements permet de tirer le maximum de ces procédés (Samson, 1994b). Un exemple est l'enrichissement d'une faible fraction du sol en microorganismes capables de dégrader les polluants. Lorsque l'enrichissement est terminé la flore indigène est réintroduite au niveau de la biopile. Cette technique permet d'augmenter la vitesse de dégradation des polluants des biopiles et le système est économique tout en étant simple.

5.2 Traitements *in situ*

L'efficacité des procédés *in situ* est moins prévisible en raison de l'hétérogénéité des polluants du sol, le gradient d'oxygène et des microorganismes et de l'eau.

L'analyse du site au niveau géologique, hydrogéologique, composition et contamination du sol est nécessaire avant d'entreprendre le traitement *in situ*. Cette technique s'avère efficace entre autre pour les produits pétroliers légers. Ce groupe comprend l'essence, le diesel et les hydrocarbures monoaromatiques (BTEX). Présentement au Québec, seulement des sites contaminés aux hydrocarbures légers sont traités par la technique *in situ*. Plus la concentration des hydrocarbures est élevée moins la décontamination est possible à cause d'une mauvaise circulation des nutriments et de

l'eau. Lorsque la quantité des hydrocarbures lourds est trop grande, des surfactants sont ajoutés pour accroître leur solubilité. Un sol sablonneux est plus propice à la décontamination qu'un sol argileux puisqu'il est plus perméable et laisse diffuser les nutriments, même si la migration est plus rapide dans un sol sablonneux.

Le traitement par bioventillation de la zone non-saturée d'eau consiste à injecter de l'air, à un débit constant et précis. Ceci a pour but de maximiser la biodégradation et de diminuer la volatilisation. Un des désavantages de cette technique est que des filtres sont nécessaires étant donné que les composantes de l'esssence sont très volatiles.

6. AMÉLIORATION DE LA DÉGRADATION

Les connaissances acquises sur les microorganismes dégradant les hydrocarbures, n'expliquent pas pourquoi la dégradation de ces composés est si lente dans les sols. Cela laisse penser que les microorganismes sont limités dans leur processus à cause des conditions environnementales. En les optimisants, cela devrait augmenter la vitesse de dégradation. Par ailleurs, ce n'est pas parce qu'une population microbienne possédant les voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures est présente que la décontamination s'effectuera plus rapidement. Pour qu'une microflore soit efficace, les paramètres de croissance doivent être maximisés pour s'assurer d'un nombre assez élevé de microorganismes.

6.1 Température

L'impact de la température se fait sentir tant au niveau des microorganismes qu'au niveau des hydrocarbures. Elle affecte la vitesse de dégradation par les microorganismes et la composition de la microflore pouvant l'effectuer, mais aussi la nature physique et chimique du pétrole. La dégradation des hydrocarbures peut s'effectuer à un large spectre de température : psychrotrophique, mésophilique et thermophilique (Margesin et Schinner, 1997). La température idéale de dégradation se

situerait entre 30°C et 40°C (Singleton, 1994; Leahy et Colwell, 1990). De basses températures entraîneraient l'augmentation de la viscosité des hydrocarbures, une diminution de la volatilisation des alcanes toxiques de courtes chaînes et une augmentation de la période d'acclimatation en affectant l'activité enzymatique microbienne (Zhou et Crawford, 1995 ; Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981). La vitesse de dégradation est accélérée à des températures élevées tandis que le phénomène inverse est observé à basse température. Diverses populations microbiennes isolées peuvent dégrader des hydrocarbures à 0°C (Zobell, 1973) et 70°C (Traxler, 1973). Les saisons et le climat permettent la sélection de microorganismes adaptés à de rudes conditions. Par exemple, Colwell *et al.* (1978) ont observé la dégradation d'hydrocarbures à 3°C par des cultures microbiennes provenant d'eau marine. Huddleston et Cresswell (1976) ont constaté la dégradation du pétrole dans un sol à une température de -1,1°C. Par contre, une dégradation négligeable a été observée au niveau des glaces marines de l'arctique (Atlas *et al.*, 1978) et au niveau de sols gelés des toundras (Atlas *et al.*, 1976).

6.2 Oxygène

L'oxygène est très important, car la voie majeure de dégradation des hydrocarbures saturés, cycliques et aromatiques implique une oxygénase et une molécule d'oxygène qui est à l'origine des réactions enzymatiques responsables de l'ouverture des cycles aromatiques (Singleton, 1994; Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1984). La disponibilité de l'oxygène au niveau du sol dépend de la vitesse d'utilisation de cette molécule par les microorganismes, du type de sol, du degré d'humidité et de la présence de substrat métabolisables (Leahy et Colwell, 1990). Il a été démontré que la concentration d'oxygène (< 5 %) est le facteur limitant la vitesse de dégradation du pétrole dans le sol (Zhou et Crawford, 1995) et de la dégradation de l'essence dans les eaux souterraines (von Wedel *et al.*, 1988). De même, au niveau de la minéralisation des hydrocarbures pétroliers, la concentration d'oxygène disponible est très importante (Freijer et al., 1990). Malgré tout, la dégradation anaérobie a été observée, cependant elle est mineure (Bossert et Bartha, 1984; Cooney, 1984; Floogate, 1984; Atlas, 1981) Fathepure et Vogel (1991) ont obtenu une dégradation d'hydrocarbures polychlorés en

utilisant une combinaison de traitements aérobie et anaérobie. Coates *et al.* (1997) ont démontré qu'une grande variété d'hydrocarbures peut être dégradée dans des conditions réductrices (sulfate) au niveau de sédiments. Ce type de dégradation constitue une bonne alternative à la dégradation aérobie pour décontaminer des sédiments enfouis sous la vase.

6.3 Nutriments

Les nutriments du sol ou ajoutés au sol ont un impact direct sur l'activité microbienne et la dégradation des composés xénobiotiques. Alors que les polluants sont la source de carbone nécessaire pour la croissance et l'énergie, les nutriments (minéraux et métaux) sont essentiels pour un bon fonctionnement cellulaire (Young et Cerniglia, 1995). L'azote et le phosphore font partie des nutriments les plus étudiés. Le rapport C :N :P optimal connu dans la littérature qui sert de point de repère est de 120 :10 :2 (Wilson et Jones, 1993). Ces deux nutriments sont de façon générale trouvés en faibles concentrations au niveau des sols et sont un des facteurs majeurs qui limitent la dégradation des hydrocarbures dans le sol et le milieu aquatique (Rosenberg et Ron, 1996; Prince, 1993; Pritchard *et al.*, 1992; Atlas, 1991; Glaser, 1991). De plus, la forme sous laquelle l'azote et le phosphore sont retrouvés dans le sol ne permet pas toujours de soutenir et de rétablir une dégradation optimale (Zhou et Crawford, 1995; Morgan et Watkinson, 1992; Raymond *et al.*, 1986; Brown *et al.*, 1984). Par contre, la réponse à cet ajout dépend du site et varie beaucoup à l'intérieur d'un même site (Bossert *et al.*, 1991; Leahy et Colwell, 1990; Bossert et Bartha, 1984). De façon générale, la réponse est immédiate (Hinchee and Arthur, 1991), tandis que dans certains cas elle est plus lente ou même inexistante (Morgan et Watkinson, 1992; Manihal et Alexander, 1991). Swindoll *et al.* (1988) ont observé que l'ajout de nutriments inorganiques réduit l'acclimatation des microorganismes nécessaire pour provoquer la dégradation dans un milieu aquatique. Par contre, Odu (1978) a constaté que l'ajout de fertilisant commercial a accéléré la dégradation des hydrocarbures dans un sol fortement contaminé 10 ou 12 semaines (Jobson *et al.*, 1974) après l'addition des nutriments. Toutefois, l'ajout du fertilisant n'a eu aucun effet dans un sol faiblement contaminé. Fedorak et Westlake (1981) ont observé

que la dégradation des *n*-alcanes était surtout stimulée lors de l'ajout de fertilisant dans un sol contaminé avec du pétrole.

De façon générale, l'excès de nutriments (azote et phosphore) n'a pas démontré d'effet inhibiteur sur la dégradation des hydrocarbures (Dibble et Bartha, 1979), mais dans certaines circonstances cela a été observé (Morgan et Watkinson, 1992). Rosenberg *et al.* (1996) ont ajouté une source d'azote insoluble pour diminuer les pertes par dilution et réduire le nombre d'organismes consommant ces nutriments. Les résultats ont démontré qu'après 28 jours d'incubation le naphtalène, le fluorène, le dibenzothiophène, l'anthracène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène et le chrysène ont été dégradés en dessous du seuil de détection. Cette étude a aussi été effectuée sur le terrain, au niveau d'un sable d'une plage contaminée accidentellement par un déversement de pétrole, et a démontré une dégradation de 90% après 4 mois d'observation de ces composés.

6.4 Microorganismes

Le sol, les eaux douces et marines et les eaux usées possèdent une très forte variété de populations microbiennes avec de vastes capacités de dégradation. Plusieurs espèces à l'intérieur de ces communautés utilisent des composés organiques comme seule source de carbone (Ramadan *et al.*, 1990). L'inoculation de ces espèces à un sol pour accélérer la dégradation des composés polluants porte le nom de bioaugmentation. Les propriétés que doivent posséder les microorganismes au niveau du sol sont : ne pas être pathogènes, être génétiquement stables, capables de survivre à la compétition avec la microflore indigène, posséder une bonne capacité de dégradation, une croissance rapide, ne pas produire de métabolites plus toxiques que le composé de départ et avoir un taux d'activité enzymatique élevé (Atlas, 1977). L'activation d'un sol est un procédé qui consiste à enrichir ce sol avec une population microbienne d'intérêt pour s'en servir comme inoculum pour la bioaugmentation. L'inoculation d'un sol activé a permis d'obtenir 20% de minéralisation du phénanthrène en deux heures et en quatre heures pour le pyrène (Otte *et al.*, 1994). L'acclimatation des microorganismes en bioréacteur a

permis d'augmenter le taux de minéralisation du phénanthrène par 30 et par 81 pour le pyrène. Kelley et Cerniglia (1991) comme Grosser *et al.* (1995) ont démontré que l'addition de *Mycobacterium* à la microflore indigène d'un sol non acclimaté à la dégradation du fluoranthène, a permis une augmentation du taux de minéralisation de ce HAP. Grosser *et al.* (1991) ont démontré que l'augmentation de l'inoculum réintroduit dans le sol affectait la minéralisation du carbazole mais n'avait aucun effet sur celle du pyrène. Cerniglia et Heitkamp (1989) ont constaté les mêmes résultats en ce qui concerne le pyrène. Il est important de noter que la survie des microorganismes introduits dans un environnement contaminé est difficile à suivre. De plus, la compétition avec la microflore indigène pour les nutriments peut affecter l'effet bénéfique de la bioaugmentation. Leahy et Colwell (1990) ont observé que l'introduction des microorganismes dans des milieux aquatiques ou terrestres contaminés au pétrole avait plus d'effets négatifs que positifs. L'addition de deux souches bactériennes possédant les capacités de dégrader le pétrole après le déversement de l'Exxon Valdez n'a eu aucun effet même si des fertilisants avaient été ajoutés. De nombreuses études ont été effectuées pour décontaminer des sols pollués par du pétrole en introduisant des microorganismes, sans pour autant obtenir des résultats positifs (Atlas, 1981). Radwan *et al.* (1997) ont observé que l'introduction d'un cocktail de microorganismes ayant une origine différente de l'environnement contaminé dans lequel il a été ajouté peut être une pratique périlleuse, car il y a concurrence entre les nouvelles souches introduites et la microflore indigène du sol.

6.5 Biodisponibilité

Un autre facteur limitant la dégradation des contaminants est leur disponibilité pour la communauté microbienne. La raison majeure de cette limitation est le fait que certains composés xénobiotiques sont hydrophobes et tendent à se lier aux particules de la matrice (Weissenfels *et al.*, 1992; Bellin *et al.*, 1990). Des études ont aussi révélé que la matière organique et l'interaction avec les minéraux jouent un rôle important (Means *et al.*, 1980; Zierath *et al.*, 1980). De plus, le degré de solubilité dans l'eau est un autre facteur affectant le transport des polluants à l'intérieure de la cellule (Miller et Bartha, 1989). Pour surmonter ce problème, des surfactants biologiques ou synthétiques ont été

utilisés pour accroître la biodisponibilité de ces composés xénobiotiques (Van Dyke *et al.*, 1993 a et b; Aronstein et Alexander, 1993 ; Jain *et al.*, 1992; Zhang et Miller, 1992). Tandis que certains chercheurs démontraient l'augmentation de la dégradation des HAP avec l'addition de surfactants non ioniques (Aronstein et Alexander, 1993; Tiehm et Zumft, 1992), d'autres montraient l'effet toxique de certains de ces surfactants (Laha et Luthy, 1992). Durant les dernières années de nombreux surfactants tant synthétiques (ioniques et non ioniques) (Pennell *et al.*, 1993; Haüsler *et al.*, 1992; Laha et Luthy, 1992; Thai et Maier, 1992) que biologiques ont été étudiés pour connaître leur capacité à accroître la disponibilité des contaminants (Miller, 1994; Scheibenbogen *et al.*, 1994; Van Dyke, 1993 a et b; Volkering *et al.*, 1993; Zhang et Miller, 1992). Malgré le fait que les résultats varient beaucoup, il semblerait que les surfactants seraient plus efficaces au niveau des contaminants absorbés à la matrice du sol (Volkering *et al.*, 1993).

6.6 pH

Les études faites en laboratoire se font à un pH neutre pour les bactéries. La minéralisation des HAP s'effectue plus rapidement à des pH entre 5 et 7.8 (Dibble et Bartha, 1979). Une augmentation ou une diminution rapide du pH peut entraîner une réduction ou une inhibition complète de la dégradation. Ce phénomène serait expliqué par le fait que le pH peut agir au niveau des enzymes responsables de la dégradation et sur la croissance microbienne. Singleton (1994) a démontré que l'ajustement du pH sur les sites contaminés augmentait la vitesse de dégradation. Verstraete *et al.* (1976) ont observé une augmentation de la dégradation de l'essence de deux fois dans un sol acide (pH de 4,5) après ajustement du pH à 7,0. Weissenfels *et al.* (1990) ont observé que la croissance optimale avec divers HAP comme seule source de carbone se faisait à un pH entre 7,0 et 7,5. A des pH plus faibles la croissance dépendait des souches étudiées. L'isolement de microorganismes possédant la capacité de croître dans des conditions extrêmes de pH aiderait à la bioaccumulation des populations microbiennes des sols ayant des valeurs de pH défavorables à la croissance bactérienne.

7. LES BOUES BIOLOGIQUES

7.1 Types de boues biologiques

Les procédés d'épuration des eaux usées produisent des boues biologiques activées qui devront par la suite être éliminées ou valorisées de façon adéquate, afin de diminuer l'impact que pourraient avoir ces déchets sur l'environnement. Les boues biologiques peuvent être classées en trois groupes : les boues de fosses septiques, les boues d'épuration municipale et les boues industrielles.

Le premier type de boues résulte de la vidange de fosses des résidences permanentes et secondaires et des commerces. Environ 6 000 tonnes de cette classe de boues seraient générées annuellement au Québec (Association Québécoise des Techniques de l'Eau, 1992). La différence entre les boues d'épuration d'eau et les boues d'usine de traitement d'eau potable réside dans le fait que les premières sont produites après le traitement de toutes les eaux usées de la municipalité, tandis que la seconde ne traite que les eaux potables. La quantité de boues d'épuration produite au Québec est de 1 000 000 tonnes par an; en ce qui concerne les boues d'usine de traitement d'eau potable, il n'existe pas de statistique de production (AQTE, 1992). Finalement, les boues industrielles sont produites lors du procédé de traitement des eaux usées d'usines telles que les raffineries de pétrole et les papetières. La composition en éléments toxiques dépend du type d'industries qui les produisent. Les industries produiraient 2 046 000 tonnes de boues par an au Québec (AQTE, 1992).

7.2 Composition

Les boues biologiques sont principalement constituées d'eau mais aussi de matières organiques, d'éléments nutritifs (tel que l'azote, le phosphore...), de matières minérales inertes, de métaux lourds et de microorganismes. Bisaillon *et al.* (1998) ont démontré que le pourcentage d'eau d'une boue biologique provenant d'une usine de traitement d'eaux usées d'une raffinerie de pétrole était de 98,6% et qu'elle contenait une microflore de $2,3 \times 10^7$ bactéries/mL. Les Tableaux 3, 4 et 5 montrent la composition de

Tableau 3: Caractéristiques chimiques des boues biologiques avant filtre-presse provenant du système de traitement des eaux usées d'une raffinerie (Bisaillon *et al*., 1998).

Paramètres	**Valeurs obtenues (mg/kg)***
Huiles et graisses	75 797
Alcanes	366
HAM	51
HAP	155
Argent	< 4
Arsenic	5,1
Baryum	130
Cadmium	<1
Chrome	38
Cobalt	< 5
Cuivre	92
Étain	19
Mercure	1,4
Molybdène	6
Nickel	53
Plomb	26
Sélénium	5,3
Zinc	175
Carbone total	4 400
Azote Kjeldahl	91 000
Phosphore	7 250
C: N: P	100:2070:165**
pH	6,9**

* poids sec
** pas en mg/kg

Tableau 4: Caractéristiques physiques et chimiques de diverses boues biologiques (Aprill *et al*., 1990).

Boues biologiques	**Contenu en eau (%)**	**Résidus totaux (mg/g)**	**Huiles et graisses (%)**
Boues provenant de "American Petroleum Institute"	47 ± 2,8	257 ± 32	35 ± 2,5
Boues contenant du créosote *	33 ± 0,7	522 ± 9	37 ± 1,2
Boues contenant du créosote et du PCP *	28 ± 0,7	422 ± 19	52 ± 1,5

* les deux boues proviennent d'une usine de préservation de bois

Tableau 5: Caractéristiques physiques et chimiques de boues biologiques (Beck. *et al*., 1996)

Paramètres	Pourcentage (%)
Contenu en eau	16 - 65
Huiles et graisses	4 - 20
Solides totaux	< 90
Solides totaux volatiles	< 80
Solides fixés	< 20
Cendres	40,5 - 70,3
Matières organiques :	
Extractibles à l'éther	3,9 - 19,8
Résines	2,85 - 15
Polysaccharides solubles	24 - 10
Hemicellulose	4 - 10
Cellulose	3,2 - 12
Protéines	8 - 44
Humus sous forme de lignine	11 - 27

différents types de boues biologiques. Un constituant important retrouvé dans les boues biologiques est représenté par les protozoaires. Ces organismes contrôleraient les populations bactériennes dans l'eau douce (Sherr et Sherr, 1987). Les protozoaires jouent un rôle dans le retard du processus de dégradation des composés synthétiques, en affectant les populations bactériennes qui effectuent cette dégradation (Zaidi *et al.*, 1989; Wiggins *et al.*, 1987).

La composition des boues d'effluents varie selon leur provenance. Par exemple, les boues industrielles contiennent des huiles, des graisses et des cendres tandis que les boues d'épuration des eaux rurales contiennent de la cellulose, de l'hémicellullose et des polysaccharides. La nature ainsi que la concentration des composés organiques dépendent de l'origine des boues d'effluent. Par exemple, les benzènes chlorés, les BPC, les HAP, les dibenzo-*p*-dioxines polychlorés et les furannes ont tous déjà été détectés dans les boues d'effluent. Généralement, les eaux usées d'industries et de municipalités possèdent une plus forte concentration de ces divers composés que les eaux usées rurales (Beck *et al.*, 1995). Les composés organiques retrouvés dans la fraction soluble, la fraction volatile et la fraction biodégradable sont facilement perdues par volatilisation et par dégradation chimique ou biologique. Par contre, les produits récalcitrants eux vont rester au niveau des solides des boues.

7.3 Transformation

La première transformation des boues biologiques avant leur valorisation est la déshydratation soit par drainage sur lit de sable, soit par filtre-presse, soit par centrifugeuse, soit par four (AQTE, 1992). La déshydratation des boues dans un four entraîne une réduction d'au moins 90 % de l'eau. Ceci permet d'obtenir un produit facile à employer sous forme de granules. Ces granules peuvent par la suite être utilisées comme engrais ou combustible. Ce traitement permet en plus de la réduction d'eau, l'élimination des pathogènes et la conservation de la valeur fertilisante des boues (AQTE, 1992). La déshydratation des boues est l'étape indispensable pour minimiser leur contenu

en eau et ainsi enfouir ou incinérer un volume moindre. La deuxième transformation est le traitement de stabilisation qui permet la diminution des bactéries pathogènes et du caractère fermentescible des boues (AQTE, 1992). Pour ce faire, les boues peuvent être traitées de manière chimique ou biologique. La stabilisation des boues est l'étape indispensable pour les utiliser comme fertilisant.

7.4 Valorisation

De façon générale les boues biologiques municipales sont éliminées entre 72 et 80 % par incinération, 11 % servent de fertilisant et 17 % sont enfouies dans des sites appropriés. En ce qui concerne la valorisation des boues biologiques, elle n'a débuté au Canada qu'en 1985 (Tableaux 6 et 7). La valorisation des boues consiste en la réutilisation d'un produit d'épuration d'eaux usées, afin d'en retirer leurs qualités intrinsèques pour les besoins d'espèces végétales et du sol récepteur (AQTE, 1992). L'épandage des boues biologiques à des sols permet entre autre de profiter des teneurs importantes en éléments nutritifs comme l'azote, le phosphore, le potassium, le calcium, le magnésium et aussi de permettre d'équilibrer le bilan humique du sol. De plus, il maintient ou améliore la fertilité des sols à court ou à long terme, tout en maintenant leur structure physique, leur capacité de rétention des éléments nutritifs ainsi que de l'eau, leur pouvoir d'échange cationique et leur activité biologique (Gigliotti *et al.*, 1997; Katterman et Day, 1989; Peterson *et al.*, 1988; Epstein *et al.*, 1976).

C'est presque exclusivement la valorisation des boues biologiques municipales qui est actuellement effectuée dans plusieurs régions du Québec, soit sous forme de fertilisant pour les sols, soit comme préparation de compost, soit en utilisant l'énergie produite lors de la combustion de ces boues. Dans les années 80, 30 % des boues municipales étaient déjà valorisées et elles étaient utilisées pour la fertilisation des sols agricoles. Par exemple, la ville de Jonquière valorise 100 % de sa production de boues biologiques activées. Son usine de traitement des eaux usées municipales produit 10 000 t de boues par an. De ces dernières, 6 000 t sont utilisées comme fertilisant pour

l'épandage sur des terres agricoles (augmentation de 30 % des récoltes) et 4 000 t entrent dans la composition du compost (Anonyme, 1997). La ville de Sherbrooke peut aussi être citée comme exemple puisqu'elle utilise 90 % des boues biologiques pour la fabrication de compost pour la valorisation horticole et 10 % pour la valorisation agricole (Anonyme, 1997). La présence de bactéries pathogènes, de composés organiques toxiques et de métaux lourds sont les principaux arguments contre la valorisation des boues biologiques comme fertilisant.

Approximativement 1 et 7 millions de tonnes de boues d'effluents sous forme solide sont produites par an au Royaume Uni et aux États-Unis, respectivement (Bruce et Davis, 1989). Aux États-Unis 13 % de ces boues sont appliquées sur des terres agricoles et 10 % sont utilisées dans l'industrie du compostage (Anonyme, 1989). En France, au Danemark, en Suisse et au Pays-Bas, 30 % sont appliquées sur des terrains agricoles. Au Royaume Uni, 50 % des boues sont couramment étendues sur les terres en culture. Ce pourcentage risque d'augmenter en raison des directives de l'Union Européenne exigeant l'arrêt des déversements des boues d'épuration dans les eaux marines.

7.5 Règles et risques de l'épandage de boues biologiques.

Le MEF et de l'EPA ont formulé des critères au niveau des polluants des boues biologiques pour protéger la santé de la population ainsi que l'environnement. Ces normes s'adressent à toutes les boues qui seront par la suite appliquées sur des terres agricoles, déposées sur des terrains à des fins d'enfouissement ou incorporées à la surface de sites. La concentration des polluants retrouvée au niveau des boues biologiques est réglementée en fonction de l'utilisation de celles-ci et des industries qui les produisent.

L'application de boues d'épuration à des terrains agricoles peut entraîner l'augmentation de la concentration de plusieurs composés organiques toxiques dans le sol ce qui pourrait influencer l'écosystème et menacer la santé humaine. Les composés sur

Tableau 6 : Les différentes utilisations des boues biologiques (AQTE, 1992).

UTILISATIONS	POURCENTAGE (%)
- Application au sol (valorisation)	16
- Mise en marché (compost et autre)	9
- Co-enfouissement	41
- Enfouissement des boues d'épuration	1
- Incinération	21
- Rejet en mer	5
- Autres	7

Tableau 7 : Statistiques liées à la valorisation agricole des boues biologiques municipales (AQTE, 1992).

Année	Nombre de municipalités	Nombre de producteurs agricoles	Quantités (tonnes de matière sèche)
1985	1	7	206
1986	1	1	44
1987	2	3	82
1988	3	9	141
1989	4	17	290
1990	7	19	1015
1991	10	30	1600

lesquels un intérêt particulier est porté sont les HAP, les BPC, les chlorobenzènes, les furannes, etc. Il a été démontré que la dégradation des composés organiques dans le sol après l'application de boues biologiques dépend des caractéristiques physico-chimiques du sol et des boues, des conditions environnementales et des propriétés des composés (Beck *et al.*, 1996).

Plus de 926 000 t de boues sont appliquées à des terres en pâturage aux États-Unis (EPA, 1989). Ces applications peuvent entraîner des risques pour l'homme. La contamination de l'homme peut se faire de façon directe ou indirecte : soit par les particules de l'air, par les eaux de surface et par les eaux souterraines. En raison de leur toxicité, la concentration de 25 composés cancérigènes ou non est surveillée attentivement. Plus de 706 000 t de boues sèches sont produites pour utilisation sous forme de compost aux Etats-Unis (EPA, 1989). Les risques à ce niveau sont le passage direct des polluants dans la chaîne alimentaire, dans le sol et les eaux de surface, la possibilité de toxicité pour les plantes, pour les organismes vivants dans le sol ainsi que leurs prédateurs.

En ce qui concerne les boues biologiques enfouies, les risques pouvant affecter l'homme se situent au niveau des eaux souterraines, des eaux de surface et de la volatilisation des composés qui émanent de ces sites. La méthode la plus utilisée pour se débarrasser des boues biologiques est l'incinération. Il est estimé que 1 651 000 t de boues sèches subissent ce traitement aux États-Unis (EPA, 1989). Dans ce cas, les risques pour l'homme proviennent des particules de l'air. Seulement huit hydrocarbures et les métaux lourds sont surveillés dans l'air provenant de l'incinération. Finalement, 276 000 tonnes de boues sèches sont appliquées à des terres agricoles dont les cultures sont destinées aux animaux aux États-Unis (EPA, 1989). Les dangers que l'homme court d'être affecté par ces polluants proviennent des eaux de surfaces ou souterraines.

8. VALORISATION DES BOUES INDUSTRIELLES

8.1 Boues biologiques industrielles

Comme ce projet a été réalisé avec des boues biologiques industrielles provenant de la raffinerie de pétrole Shell située à Montréal-Est, nous nous limiterons à ces boues dans cette section.

Depuis les années 1973, tous les effluents contaminés provenant des divers procédés de raffinage du pétrole, en vertu des articles 33 et 34 de la loi sur les pêcheries du Québec, doivent être traités de façon directe ou indirecte. Pour ce faire, un traitement biologique, nommée aération prolongée, est employé pour répondre aux normes du gouvernement. Les règlements émis par le gouvernement fédéral visent à limiter les rejets d'huiles et graisses, de phénols, de sulfures, d'azote ammoniacal et de matières en suspension de toutes sortes (Geoffrion, 1981).

La raffinerie Shell de Montréal-Est traite 130 000 barils de pétrole brut par jour (Geoffrion, 1981). Les sources d'eaux usées de la raffinerie se séparent en quatre groupes soit les eaux de procédés qui génèrent 3 millions de gallons par jour, les eaux d'ébouage des chaudières qui en libèrent 200 000 gallons par jour, les eaux pluviales dont le volume est variable et les eaux de ballast qui engendrent 300 000 gallons par jour (Geoffrion, 1981). Toutes les eaux usées de la compagnie sont acheminées au séparateur par gravité muni de plaques ondulées qui permettent de récupérer la majeure partie des huiles et graisses et des matières en suspension. Pour se débarrasser des traces restantes de ces deux composantes, les eaux usées séjourneront dans un réservoir de flottaison. Pour réduire la concentration des contaminants, les eaux usées sont par la suite introduites dans un bassin d'égalisation, puis dans un bassin d'aération pour subir un traitement biologique. Dans ce bassin des organismes de toutes sortes auront comme fonction de réduire la concentration des polluants. L'air et les nutriments nécessaires pour la croissance et le métabolisme des microorganismes sont fournis. Il est important de noter que le pH des différents effluents est ajusté pour permettre aux microorganismes du

bassin d'aération de survivre et ainsi effectuer leur travail de décontamination. L'eau traitée sera acheminée vers deux clarificateurs pour la séparation des liquides et des solides avec l'aide d'alun qui est un agent coagulant. L'eau décontaminée est dirigée vers le fleuve, tandis qu'une partie des matières solides, comprenant les microorganismes, est réintroduite dans le bassin d'aération pour maintenir l'activité biologique. Ces matières en suspension sont appelées boues biologiques. Les boues en excès sont acheminées vers un épaississeur et finalement dans un filtre-presse pour être ensuite enfouies.

8.2 Devenir des boues biologiques industrielles

Les données indiquent que les boues biologiques industrielles, plus particulièrement des papetières québécoises, après déshydratation, sont enfouies à 81 %, 14,2 % sont incinérées, 3,7 % sont compostées et 0,7 % sont valorisées (AQTE, 1992). Pour ce qui est des boues provenant de la métallurgie, elles sont envoyées après déshydratation dans des centres de gestion des déchets et d'analyses. Ces boues sont généralement incorporées à un matériel du type du ciment (AQTE, 1992). La quantité de boues biologiques en surplus de la raffinerie Shell est d'environ 225 kg par jour (poids sec) (Geoffrion, 1981). Tout ce surplus sera acheminé sur un site pour fin d'enfouissement.

8.3 Exemples de valorisation

Les déchets organiques industriels et domestiques tels que les déchets de manufactures de produits organiques, d'usines de pâtes et papier, d'usines de textiles, d'usines de préservation des aliments et des industries du charbon, sont valorisés depuis de nombreuses années en les appliquant à des sols (Sànchez *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 1996; Alcock *et al.*, 1993; Kjeller *et al.*, 1991; Wild *et al.* 1991; Bellin *et al.*, 1990). Wang *et al.* (1995) ont observé entre les années 1951 et 1960 que 25 applications par année de boues contenant des benzènes chlorés à du sable a permis une forte disparition de ce composé. La seule exception a été l'hexachlorobenzène (HCB) qui a subi une dégradation plus lente. Wild *et al.* (1991) ont observé entre les années 1942 et 1961 le

même phénomène lorsqu'un sol sablonneux a reçu 25 applications de boues d'épuration contenant du benzo[a]anthracène. Des analyses effectuées en 1990 ont révélé que le sol avait conservé 60 % du benzo[a]anthracène 19 ans après l'arrêt de l'application des boues. La concentration de la plupart des produits chimiques organiques récalcitrants à la dégradation ont tendance à augmenter avec le nombre d'applications (Alcock *et al.*, 1993).

L'augmentation de la matière organique due à l'addition de boues biologiques peut entraîner une plus grande adsorption des composés organiques. Ceci a pour conséquence d'accroître la persistance de ces composés dans le sol (Beck *et al.*, 1996; Wilson et Jones, 1993).

La majorité des études effectuées avaient comme objectif la dégradation des contaminants des boues en les incorporant à un sol. Il existe d'autres façons de valoriser les boues comme par exemple pour favoriser la biorémédiation de sols contaminés. La recherche effectuée dans le présent travail s'inscrit dans cet objectif. D'ailleurs, peu de recherches ont été effectuées dans le but d'utiliser des boues biologiques pour améliorer la dégradation de contaminants retrouvés dans des sites pollués. Par exemple, Frigon *et al.* (1997) ont effectué le biotraitement d'un sol contaminé aux benzènes chlorés en y ajoutant des nutriments ou des boues municipales. Avec l'ajout de nutriments, une disparition de 92 % des composés s'est produite après 10 jours d'incubation. L'addition de boues municipales au lieu de nutriments a amélioré cette dégradation puisque celle-ci a été de 99 % en seulement cinq jours. La fraction résiduelle des composés adsorbés au sol ou aux boues s'est avérée être entre 0,1 % et 4 % de toute la quantité éliminée.

Kästner *et al.* (1995) ont étudié l'effet de l'addition de compost sur la dégradation de deux hydrocarbures marqués, l'anthracène et l'hexadécane. L'addition de compost a permis de stimuler la dégradation des hydrocarbures ainsi que des composés aliphatiques

contaminant un sol. Ces auteurs ont observé que l'anthracène marqué était transformé en CO_2 à 23 % tandis que l'hexadécane l'était à 53 %. Ceci suggère que l'ajout de compost au sol supporte et accélère les activités de minéralisation dans le sol. Mais il semblerait que 42 % et 21 % de ces composés, respectivement, seraient fixés à la matrice organique et que contrairement à Weissenfels (1991) ces liens résistent à l'extraction. Kästner *et al.* (1995) ont conclu que l'addition de compost serait une méthode peu coûteuse pour détoxifier et dépolluer un sol en stimulant la minéralisation des hydrocarbures xénobiotiques en dioxyde de carbone.

Carson *et al.* (1996) ont démontré que l'ajout de boues activées provenant d'une industrie manufacturière de glyphosate à un réacteur contenant comme seule source de carbone du N-phosphonométhyliminodiacétique (PIA), permet la conversion du PIA en acide aminométhylphosphonique (AMPA). Grâce à un marqueur radioactif lié au PIA, ils ont pu observer que plus de 90% de ce marqueur était libéré en 7 jours sous forme de CO_2 dans les échantillons qui ont reçu des boues activées comparativement à un réacteur sans boues. Ils ont aussi constaté que le temps requis pour dégrader 7,5 mM de PIA a été diminué de 21 jours à moins de 3 jours après l'addition de boues activées.

van Ginkel *et al.* (1997) ont démontré que l'ajout de boues biologiques, provenant d'une usine de traitement d'eaux domestiques, à un réacteur en semi-continu de type boues activées, dans des conditions alcalines, a permis la dégradation de la presque totalité de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA). Les résultats obtenus au niveau laboratoire ou sur le terrain dans des réacteurs ont démontré une disparition de plus de 90 % de l'EDTA à un pH alcalin tandis qu'à un pH de 6,7 il n'y a eu aucune dégradation de ce composé.

Bisaillon *et al.* (1998) ont fait des études au niveau d'un biotraitement qui avait pour but d'améliorer la dégradation des hydrocarbures. Le sol utilisé provenait de la

sablière Thouin qui a reçu de nombreux déversements de produits pétroliers. Le Tableau 8 montre que ce sol contient une forte concentration de HAP et d'huiles et graisses et qu'il est déficient en azote. Des boues biologiques provenant d'une usine de traitement d'eaux usées d'une raffinerie de pétrole ont été ajoutées au sol. Le Tableau 3 présenté précédemment révèle que ces boues contiennent sur une basse sèche une forte concentration en azote et en huiles et graisses. Les résultats obtenus à l'échelle du laboratoire ont permis de conclure que les microcosmes contenant du sol de la sablière Thouin auquel des boues avant filtre-presse ont été ajoutées, a entraîné une dégradation plus rapide des alcanes et des HAP. Suite à l'addition de boues biologiques la dégradation des HAP est passée de 49 % à 77 % après 30 jours d'incubation, tandis que la dégradation des alcanes est passée de 24 % à 93 %. Ces auteurs ont conclu que les boues biologiques, considérées comme un déchet industriel, sont valorisables puisqu'elles ont permis l'amélioration du traitement de sols sablonneux contaminés aux hydrocarbures. Contrairement aux résultats obtenus avec les boues avant filtre-presse, l'addition de boues après filtre-presse n'a pas entraîné une telle amélioration.

Dans le présent travail, nous nous proposons de déterminer les facteurs importants des boues biologiques qui favorisent l'accélération de la dégradation des hydrocarbures dans un sol contaminé provenant de la sablière Thouin. Les objectifs secondaires étaient de vérifier si les HAP et les alcanes étaient minéralisés et d'analyser les populations microbiennes agissant au niveau de la dégradation des composés.

Tableau 8: Caractéristiques chimiques d'un échantillon du sol prélevé de la sablière Thouin (Bisaillon *et al*., 1998)

Paramètres	**Valeurs obtenues (mg/kg)***
Huiles et graisses	6 782
Alcanes	113
HAM	31
HAP	416
Argent	< 2
Arsenic	0,7
Baryum	2,3
Cadmium	< 2
Chrome	26
Cobalt	5
Cuivre	6
Étain	< 2
Mercure	0.1
Molybdène	< 0,5
Nickel	9
Plomb	20
Sélénium	< 0,1
Zinc	28
Carbone total	5 337
Azote Kjeldahl	96
Phosphore	1 158
C: N: P	100:2:22**
pH	6,98**

* poids sec
** pas en mg/kg

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. SOLS

1.1 De la sablière Thouin

1.1.1 Échantillonnage et conservation du sol

Le sol contaminé aux hydrocarbures provient de la sablière Thouin localisée à l'Assomption, au nord de Montréal (Québec). Ce site a reçu de nombreux déversements de pétrole durant les années 1966 à 1968. Un premier lot de référence de ce sol a été constitué en juillet 1993. C'est un mélange composite entre des échantillons de sol possédant des niveaux de contaminations différents, afin d'obtenir un sol de contamination légèrement au-dessus du critère C pour sa teneur en huiles et graisses. La concentration de ces contaminants était d'environ 7 000 ppm. En ce qui concerne la caractérisation chimique de ce mélange, celle-ci a été réalisée dans des études précédentes par Lirette (1996) (Tableau 8). Un deuxième lot a été effectué en juillet 1997 dans le cadre d'une étude en biopile afin d'obtenir un sol plus fortement contaminé. La concentration finale d'huiles et graisse de ce mélange était de 12 000 ppm. Des lots de référence de ces mélanges ont été conservés à 4 °C en absence de lumière.

1.1.2 Caractérisation microbienne

1.1.2.1 Dénombrement des bactéries totales

Une variation de la technique mise au point par Bogardt et Hemmingsen (1992) a été effectuée pour l'énumération des populations bactériennes du sol et des boues. Une quantité de 50 g de sol a été ajoutée dans un contenant en polypropylène stérilisé dans un autoclave à 120 °C pendant 15 minutes à 15 si. Un volume de 100 mL du milieu minéral Bushnell-Haas (BH) (Difco, Détroit) stérilisé a été ajouté. La composition du milieu minimal minéral BH par litre fut la suivante : 0,2 g de sulfate de magnésium, 0,02 g de chlorure de calcium, 1 g de monopotassium de phosphate, 1 g de phosphate d'ammonium dibasique, 1 g de nitrate de potassium et 0,05 g de chlorure ferrique. Ce mélange a été agité vigoureusement à 1 000 rpm sur un agitateur mécanique pendant une période de 20 minutes. Suite à cette agitation, le mélange a été laissé au repos pendant 5 minutes pour permettre la décantation. Finalement, le surnageant a été centrifugé pendant 10 minutes à 2 000 x g pour faire sédimenter les particules de sol et les matières en suspension. Un

volume de 0,1 mL du surnageant a été pipetté dans un tube stérile contenant 0,9 mL d'un tampon phosphate salin (PBS) stérile pour obtenir la première dilution (10^{-1}). Un volume de 100 µl de cette dilution a été ajouté à un nouveau tube contenant 900 µl de PBS pour obtenir la dilution 10^{-2}. Il en a été de même jusqu'à la dilution 10^{-6}. Deux milieux solides de composition différente ont été utilisés soit le milieu TSA (Tryptic Soy Agar) et le milieu BH enrichi de 0,05 % (p/v) d'extrait de levures (EL) (Grand Island Biological Compagny, New-York). Sur chacun des milieux, 100 µl de chacune des dilutions (10^{-1} à 10^{-6}) ont été inoculés et ces derniers ont été incubés à 30 °C jusqu'à ce qu'une bonne croissance était apparente. Le milieu TSA a été incubé pendant 10 jours, alors que le milieu BHEL 0,05 % l'a été pendant deux semaines. Le nombre des colonies a été évalué et exprimé en unités formatrices de colonies (UFC) par gramme de sol humide.

1.1.2.2 Dénombrement des bactéries dégradant les HAP

Trois techniques ont été effectuées pour dénombrer les bactéries du sol et des boues dégradant les HAP. La première fut la technique sur milieu solide qui consiste à vaporiser un mince film du composé d'intérêt sur le milieu sur lequel les microorganismes se sont développés (Lirette, 1996). Le dénombrement s'effectue à l'aide de triplicata. La méthode de récupération de la microflore indigène est identique à celle mentionnée précédemment pour l'énumération des bactéries totales. Lorsque la croissance a été jugée suffisamment abondante, une solution de phénanthrène 2 % (p/v) dans de l'acétone a été vaporisée sur les divers milieux de culture. L'incubation a été effectuée à 30 °C, en absence de lumière, jusqu'à l'apparition de zones d'éclaircissement (halos) autour de certaines colonies. Toutefois la période d'incubation n'a jamais dépassé 7 jours. Le nombre de colonies entourées d'un halo a été exprimé en UFC par gramme de sol et a aussi été comparé au nombre total de colonies dénombrées sur le milieu. Une analyse un peu plus approfondie de certaines colonies a été effectuée dans le but de connaître l'étendue de leur spectre d'action. Les colonies produisant un pigment brun lors de la dégradation du phénanthrène ont été sélectionnées puis inoculées sur milieu Plate Count Agar (PCA). Après incubation de ces milieux à 30 °C pendant deux semaines, des

solutions de fluorène, de fluoranthène et de pyrène à raison de 2 % (p/v) dans de l'acétone ont été vaporisées et l'incubation s'est poursuivie jusqu'à l'apparition de halos.

La deuxième technique consiste à incorporer de l'indole dans un milieu « Tryptic Soy Agar » (TSA). Comme précédemment, le dénombrement s'effectue à l'aide de triplicata. Les microorganismes exprimant une dioxygénase peuvent transformer l'indole en indigo grâce à cette enzyme (O'connor *et al.*, 1997). La récupération des microorganismes du sol a été effectuée comme précédemment. Avant de couler les milieux TSA dans des plats de Pétris stériles, une solution de 100 mM d'indole dans de l'éther a été incorporée dans le milieu liquéfié pour obtenir une concentration finale de 1mM d'indole. Sur ces milieux solides, 100 µl de chacune des dilutions (10^{-1} à 10^{-6}) ont été inoculés et ces derniers ont été incubés à 30 °C pendant 10 jours. Le nombre de colonies ayant produit un pigment bleu a été exprimé en UFC par gramme de sol humide et a aussi été analysé en fonction du nombre total de colonies qui ont poussé sur le milieu TSA. De plus, pour s'assurer que les colonies transformant l'indole en pigment bleu (indigo) peuvent dégrader les HAP, ces cultures solides ont été vaporisées avec une solution de phénanthrène en raison de 2 % (p/v) dans de l'acétone.

Finalement, la dernière technique est celle du nombre le plus probable en milieu liquide. Cette procédure ressemble beaucoup à celle élaborée par Wrenn et Venosa (1995) en micro-plateaux à 96 puits avec différents alcanes et HAP comme seule source de carbone. Nous avons développé une technique similaire mais dans des bouteilles sérologiques. Après avoir stérilisé les bouteilles sérologiques, 1 mL d'une solution-mère de 1 000 ppm de phénanthrène dans de l'éther a été ajouté. Après l'évaporation du solvant (18 heures), 9 mL de milieu BH stérile a été ajouté et 1 mL de la suspension microbienne récupérée du sol ou des boues pour obtenir la dilution 10^{-1}. Dans le cas des contrôles négatifs, la même procédure a été effectuée excepté que le phénanthrène n'a pas été ajouté. La bouteille a été bien agitée sur un agitateur de type Sybron pendant 30 s et 1 mL a été pipetté et ajouté dans la bouteille suivante pour produire la dilution 10^{-2}. Les

Les dilutions ont été effectuées jusqu'à 10^{-6} et dans certain cas jusqu'à 10^{-9}. Toutes les bouteilles ont été incubées à 27 °C et agitées à 2 000 rpm (agitateur New Brunswick) pendant 10 jours. La croissance des populations microbiennes a été confirmée par la turbidité des cultures biotiques comparativement aux contrôles négatifs (Shuttleworth et Cerniglia, 1996).

1.1.2.3 Dénombrement des bactéries dégradant les alcanes

Un seul test a été effectué pour le dénombrement des bactéries dégradant les alcanes soit le nombre le plus probable en milieu liquide contenant de l'hexadécane. Une procédure semblable à celle présentée précédemment pour le phénanthrène a été effectuée. Le solvant utilisé pour la solution-mère de 1 000 ppm d'hexadécane est l'hexane. L'hexadécane a été ajouté à chacune des bouteilles sérologiques de sorte à obtenir une concentration finale de 100 ppm. L'évaluation de la croissance des populations microbiennes a été effectuée de la même façon que pour le phénanthrène.

1.2 Sol contaminé au créosote

Un sol tout à fait différent de celui de la sablière a été choisi pour réaliser certaines expériences. Ce sol provenait d'un site contaminé au créosote et il avait une texture floconneuse et une couleur noire. Un lot de référence a été conservé à 4 °C en absence de lumière. Nous n'avons pas effectué la caractérisation chimique ou microbienne de ce sol.

2. BOUES BIOLOGIQUES DE LA RAFFINERIE DE PÉTROLE

2.1 Échantillonnage et conservation des boues

Les boues biologiques provenaient de l'usine de traitement des eaux usées de la raffinerie de pétrole Shell située à Montréal-Est. Elles ont été prélevées avant le filtre-presse et après l'épaississeur en août 1996. Un lot de référence de ces boues a été conservé à 4 °C et à la noirceur.

2.2 Caractérisation chimique

La caractérisation chimique de ces boues a déjà été effectuée par Bisaillon *et al.* (1998) (Tableau 3). Dans la présente étude, la concentration de l'azote ammoniacal, des nitrites et des nitrates dans les boues, les boues autoclavées et filtrées a été déterminée à l'aide des techniques standards par les Laboratoires ECO, Pointe-Claire, Québec.

2.3 Caractérisation microbienne

2.3.1 Dénombrement des bactéries totales

La technique employée pour le dénombrement des populations microbiennes des boues biologiques a été effectuée de façon similaire à celle mentionnée lors du dénombrement des bactéries totales du sol (section 1.1.2.1). La différence réside dans la quantité de boues utilisée pour la récupération des microorganismes. Un volume de 27 mL a été ajouté au 100 mL de milieu BH. Le nombre de colonies sur le milieu PCA a été évalué et exprimé en UFC par mL de boues.

2.3.2 Dénombrement des bactéries dégradant les HAP

Les techniques utilisées pour dénombrer la flore indigène des boues biologiques dégradant les HAP sont similaires à celles décrites précédemment dans la section 1.1.2.2. La récupération des microorganismes s'est effectuée à partir de 27 mL de boues. Le nombre des colonies formatrices de halos ou de pigment bleu ont été exprimé en UFC par mL de boues biologiques et comparé au nombre de colonies totales sur chacun des milieux.

2.3.3 Dénombrement des bactéries dégradant les alcanes.

Le dénombrement des populations bactériennes dégradant les alcanes a été effectué selon la même procédure que celle mentionnée à la section 1.1.2.3. La seule divergence se situe au niveau de la quantité de boues prise lors de la récupération des microorganismes, soit de 27 mL.

3. CULTURES EN MICROCOSMES

3.1 Conditions de culture

Les microcosmes utilisés dans cette étude étaient constitués de 50 g de sol de la sablière Thouin sursaturés par l'addition de 27 mL d'eau ou de boues (environ 50 % (v/p) sur base humide et 0,7 % (p/p) sur base sèche) dans un erlenmeyer stérile de 500 mL. Le fait d'être sursaturé signifie qu'un mince film de liquide recouvre le sol. Les microcosmes ont été incubés à la température ambiante et en absence de lumière. Ils ont été agités une fois par jour à 400 rpm pendant 5 minutes à l'aide d'un agitateur New Brunswick modèle G (New Jersey). Le pH a été mesuré et maintenu à des valeurs comprises entre 6,75 et 7,5 par l'addition d'une solution de HCL 1 Mou de NaOH 1 M. Une fois par semaine la perte de poids de l'erlenmeyer et de son contenu, a été déterminée et de l'eau a été ajoutée pour compenser l'évaporation. Ces microcosmes ont permis de suivre les paramètres suivants : dégradation des HAP et des alcanes (section 4), l'azote des boues (section 3.2), les microorganismes des boues (section 3.2) et du sol (section 3.3) et l'efficacité du traitement.

3.2 Azote et microorganismes des boues

Pour déterminer quels éléments des boues biologiques sont impliqués dans l'amélioration de la dégradation des hydrocarbures, elles ont été remplacées dans certaines cultures en microcosmes par de l'azote organique (urée, Bio-rad) ou de l'azote inorganique (nitrate d'ammonium, Aldrich). La concentration d'azote ajoutée au microcosme a été calculée de façon à obtenir l'équivalent de celle ajoutée via les boues biologiques. Ces microcosmes ont été additionnés de 27 mL d'une solution d'urée ou de nitrate d'ammonium pour obtenir une concentration finale de 1,3 mM.

La filtration et l'autoclavage ont été utilisés pour analyser l'effet des microorganismes des boues biologiques sur la dégradation des HAP et des alcanes. Les boues biologiques ont tout d'abord été centrifugées à 10 000 x g pendant 30 minutes avec une centrifugeuse Beckman modèle J-25 Quick muni d'un support JLA pour enlever les

plus grosses particules en suspension. Puis le surnageant a été recueilli pour être filtré trois fois avec des membranes de porosités différentes soit 5 µm (Sartorius), 0,45 µm (Millipore) et 0,2 µm (Gelman). Les boues biologiques ont été autoclavées à 121 °C pendant 20 minutes. Les boues autoclavées et le filtrat ont été conservées à 4 °C à la noirceur avant leur utilisation. Le volume de filtrat ou de boues autoclavées ajouté a été le même que celui utilisé pour les boues non traitées, c'est à dire 27 mL.

Des contrôles abiotiques ont aussi été effectués pour chacune des cultures biotiques appropriées. Ces contrôles abiotiques sont semblables aux cultures biotiques à l'exception que 2 mL de $HgCl_2$ d'une solution-mère de 10 M et 1 mL d'HCl 10 M ont été ajoutés afin d'inhiber la microflore indigène du sol et des boues biologiques. Le contrôle abiotique permet de déterminer toute perte autre que par biodégradation, comme par exemple, la volatilisation et l'adsorption. Par comparaison des résultats obtenus pour les microcosmes abiotiques et biotiques, il est possible de déterminer la concentration d'hydrocarbures dégradée et par conséquent de calculer le pourcentage de biodégradation des divers composés étudiés (section 4.1.2).

3.3 Microflore du sol

Dans certaines expériences, le sol a été irradié afin de déterminer la capacité de la microflore indigène de celui-ci à dégrader les HAP et les alcanes. Cinq cents grammes de sol du lot le plus contaminé ont été irradiés au Centre d'Irradiation du Canada, ville de Laval, à raison de 70 Mrads pendant une période d'une heure. Cette dose d'irradiation a été utilisée pour que tous les microorganismes, incluant les virus, soient éliminés. Un test de stérilisation sur le sol ainsi traité a été effectué sur milieu PCA. Pour ce faire, les microorganismes ont été récupérés du sol irradié comme mentionné précédemment et 100 µL de la suspension résultante ont été inoculés sur un milieu solide. Ce dernier a par la suite été incubé à 30 °C pendant deux semaines. La comparaison des résultats obtenus dans ces microcosmes avec ceux des microcosmes dont le sol n'a pas été irradié a permis

de déterminer l'importance de la microflore indigène du sol au niveau de la dégradation des HAP et des alcanes.

4. CONCENTRATION DES POLLUANTS DANS LES MICROCOSMES

4.1 HAP et alcanes

Pour les premières expériences, une centaine de composés ont été suivie, dont 50 HAP et 50 alcanes. Par la suite, l'analyse ne s'est effectuée qu'avec 80 composés pour finalement ne suivre que 44 composés (voir les Tableaux 10 et 11).

4.1.1 Extraction et analyses

Tout le contenu de l'erlenmeyer, soit le sol et les boues ou l'eau, a été mis en suspension avec 20 mL d'eau Milli-Q et a été déposé dans une bouteille Beckman de 500 mL en polypropylène. Cette procédure a été répétée quatre fois avant d'ajouter 1 mL d'acide chlorhydrique concentré (12 M), ceci pour ajouter un proton aux acides gras présents dans la matrice pour annuler leur effet détergent. Puis, les hydrocarbures ont été extraits quatre fois à l'acétate d'éthyle (Anachemia Science). La première extraction a été effectuée à l'aide de 40 mL d'acétate d'éthyle qui ont été ajoutés grâce à un distributeur avec jauge automatique de 20 mL. La bouteille de polypropylène a été fermée avec un bouchon étanche et agitée pendant 10 minutes à raison de 300 coups par minute (Gallenkamp). Par la suite, le mélange a été centrifugé (Beckman modèle J-21C muni d'un support JLA) à 6 000 x g. À l'aide d'une pipette Pasteur, la phase organique contenant les hydrocarbures a été prélevée et transférée dans un erlenmeyer de 125 mL contenant 10 g de Na_2SO_4 (Anachemia). L'erlenmeyer a été agité pour bien déshydrater le solvant et le tout a été laissé au repos pendant 5 minutes. Le solvant a été finalement décanté et filtré à l'aide d'un entonnoir muni d'un coton et de 10 g de sulfate de sodium anhydre préalablement rincé avec de l'acétate d'éthyle. Le filtrat a été récupéré dans une fiole jaugée de 100 mL. Un nouveau volume d'acétate d'éthyle a été ajouté, soit 20 mL, à la bouteille Beckman et le mélange a été agité et centrifugé pour pouvoir extraire la phase organique. Ces étapes ont été répétées deux autres fois. Un volume de 20 mL a été ajouté

la fin des extractions pour récupérer les hydrocarbures qui sont restés dans l'erlenmeyer. Il est important de mentionner qu'un volume de 120 mL d'acétate d'éthyle a été utilisé pour l'extraction, mais qu'à la fin il ne reste qu'un peu moins de 100 mL dû à des pertes par évaporation et aussi à l'étape du sulfate de sodium anhydre. Le volume final des quatre extractions a été complété à 100 mL dans la fiole jaugée. Deux aliquotes de 1 mL ont été prélevés de cette solution-mère à l'aide d'une seringue en verre de 1 mL et déposés dans des bouteilles de dosage pour chromatographie en phase gazeuse (CG). Une des deux bouteilles servira pour l'évaluation de la concentration des hydrocarbures, tandis que la seconde sera utilisée seulement dans les cas où une contre vérification serait nécessaire.

4.1.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

Avant l'injection de l'échantillon au CG, 100 µL d'une solution de standards internes, conservée à –4 °C, ont été ajoutés à la bouteille contenant l'aliquote. Les trois standards qui ont été utilisés sont le 1-phényl-1-propyne (std1), le phénanthrène D10 (std2) et le 9,10-diméthylanthracène (std3) (Aldrich Chemical) à raison de 55, 50 et 35 mg respectivement dans 50 mL d'une solution de 20 % d'éthyle éther et 80 % de cyclohexane. Le dosage a été effectué sur un chromatographe à phase gazeuse couplé à un spectrophotomètre de masse (CG/SM). Le chromatographe en phase gazeuse (CG) est un Varian 3 500 couplé à un spectrométre de masse Finnigan MAT 800. Le CG est muni d'un injecteur «split-splitless ». L'injecteur est en mode fermé (*splitless*) et après 30 secondes il s'ouvre (*split*) avec un rapport de fuite de 50 pour 1. La pression à la tête de la colonne est gardée constante à 24,7 si tout au long du programme de températures (le débit à 40 °C est de 2,7 mL d'hélium/minute). Les conditions chromatographiques du CG/SM sont présentées dans le Tableau 9.

Avant de faire toutes injections, le chromatographe en phase gazeuse couplé au spectromètre de masse a été calibré et vérifié. La première injection est effectuée à l'aide de l'acétate d'éthyle pour effectuer un blanc d'injection et pour valider et observer le

bruit de fond de la colonne. Par la suite, une solution de HAP et d'alcanes a été injectée en raison de 100 µL. Cette injection sert à la détermination des temps de rétention de chacun des composés étudiés. La surface calculée pour chacun des standards std1, std2 et std3 doit être semblable à celle observée au niveau des droites d'étalonnage, sinon la solution doit être injectée de nouveau. La concentration finale des standards est calculée pour 1 mL, soit l'aliquote de l'échantillon. Finalement, les injections des échantillons peuvent commencer, mais il faut toujours vérifier la surface des trois standards pour valider notre injection.

Les concentrations de chacun des composées dans les divers microcosmes ont été obtenues à l'aide d'un système informatisé de traitement de données. Il faut tout d'abord déterminer le facteur de réponse relatif selon le standard interne approprié, c'est-à-dire l'analyse de tous les composés qui possèdent un temps de rétention dans la région correspondant au standard interne. On obtient le facteur de réponse relatif (F.R.R.) qui est déterminé à partir des concentrations connues de la solution standard, selon la formule :

$$F.R.R. = (A / B) (C / D)$$

A correspond à la concentration de l'analyte en ppm contenu dans l'échantillon injecté. B correspond à la surface sous la courbe de l'analyte observé sur le chromatogramme pour l'intervalle de masse utilisé. C correspond à la concentration en ppm du standard interne ayant le temps de rétention le plus près de l'analyte et finalement le D correspond à la surface du standard interne utilisé pour l'intervalle de masse correspondant. Par la suite, la concentration des analytes présents dans l'échantillon injecté peut être déterminée par la formule :

$$E = F.R.R. * C * B / D$$

E est exprimée en mg/L d'analytes présents dans l'échantillon prélevé. Finalement, les résultats sont exprimés en mg/kg de matière sèche en tenant compte du prélèvement utilisé, des dilutions ou concentrations et du pourcentage d'humidité d'après l'équation suivante :

$$RÉP = E * V / (P * PS)$$

Tableau 9: Conditions chromatographiques du CG/SM pour les analyses des hydrocarbures.

Paramètres	**Valeurs**
Température initiale	40 °C
Palier	2 minutes
Gradient de température	10 °C/min
Hausse de la température jusqu'à	120 °C
Gradient de température	3 °C/min
Hausse de la température jusqu'à	180 °C
Gradient de température	6 °C/min
Hausse de la température jusqu'à	310 °C
Palier	8 minutes
Mode d'injection	*Splitless*, après 30 s en mode split
Proportion du split	50 pour 1
Gaz vecteur	Hélium
Pression	24,7 psi à 40 °C (pression constante)
Débit du gaz	2,7 mL/min
Volume d'injection	1 µL
Type de colonne	Capillaire DB-5
Température injecteur	250 °C
Température de la ligne de tranfers	270 °C
Température de la trape ionique	270 °C
Fenêtre de masse utilisée	35 à 440 u.a.

V signifient le volume en litre de la solution d'extraction. Le P correspond à l'aliquote en poids humide en kg de l'échantillon. PS expriment le pourcentage de poids sec d'un échantillon divisé par cent.

4.2 Hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}

Contrairement à la méthode du MEF, l'extraction a été effectuée avec de l'acétate d'éthyle au lieu de l'hexane. Ce choix a été motivé par le fait que le sol utilisé dans les microcosmes est riche en HAP légers et lourds. Bisaillon *et al.* (1998) ont démontré que cette extraction était aussi valable que celle effectuée avec de l'hexane et même qu'elle permettait d'extraire plus de HAP lourds que celle du Ministère. Les mêmes procédures d'extraction des hydrocarbures de la section 4 ont été utilisées sauf que l'analyse a été réalisée avec un CG-FID. Comme pour l'analyse des HAP et des alcanes, la concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} a été déterminée grâce à un standard et à l'aire sous la courbe. Les conditions du CG/FID lors de l'injection était de 70 °C au point de départ et par la suite la température est montée à 120 °C pour une période de 20 minutes. Après la température a augmenté jusqu'à 170 °C pendant 2 minutes et finalement elle a graduellement augmenté pour atteint 310 °C sur une période de 20 minutes.

5. SUIVI DES POPULATIONS BACTÉRIENNES

5.1 Milieux solides

Lors des expériences effectuées avec le sol Thouin, les différents microcosmes ont été dédoublés afin de suivre la population microbienne totale et celle qui possédait la voie métabolique de dégradation des HAP ainsi que la capacité de transformer l'indole en indigo. Pour ce faire, à chaque temps d'incubation, tout le contenu de l'erlenmeyer a été versé dans une bouteille stérile (Beckman) à laquelle 100 mL de BH stérile ont été ajoutés. Le tout a été vigoureusement agité à raison de 300 coups par minute, pendant 20 minutes, à l'aide d'un agitateur (Gallenkamp). Les étapes suivantes ont été identiques à celles effectuées pour la détermination des bactéries totales (section 1.1.2.1) ou des

bactéries dégradant les HAP (section 1.1.2.2) sur milieux solides, sauf que les milieux PCA et R2A à base de sels minéraux et de glucose ont été ajoutés. Comme pour le milieu TSA, ils ont été incubés pendant 10 jours.

La concentration des populations bactériennes des microcosmes dans le sol contaminé au créosote ont aussi été étudiée sur milieu PCA pour s'assurer que la très forte concentration de créosote n'affectait pas la croissance microbienne. L'analyse a été effectuée sur les microcosmes de départ et ceux après 7 jours d'incubation. Pour ce faire, comme pour le dénombrement microbien, tout le contenu de l'erlenmeyer a été extrait avec 100 mL de BH. Un inoculum de 100 µL de la suspension microbienne résultante a été étalé sur milieu PCA et ce dernier a été incubé pendant 10 jours à 30 °C.

5.2 Milieu liquide

La même procédure que celle effectuée à la section 2.3.3 a été réalisée avec des microcosmes en présence ou non de boues pour suivre les populations dégradant l'hexadécane comme seule source de carbone.

5.3 PCR

5.3.1 Extraction de l'ADN génomique

La première étape de l'extraction de l'ADN du sol, des boues biologiques ou des divers microcosmes a consisté à mélanger 250 mg (poids humide) de l'échantillon de départ avec 250 mg de billes de verre d'un diamètre de 0,4 - 0,5 mm (Braun Co., Melsungen, Germany) et 1 mL de TEP (50 mM Tris-HCl à pH 8,0, 10 mM EDTA et 1 % de polyvinylpolypyrollidone (PVPP, America Chemical Ltd, Montréal)) dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Le tube a été conservé dans la glace pendant 10 minutes. Le mélange a été par la suite homogénéisé et le broyage des cellules a été effectué à l'aide d'un agitateur (Sybron/Bickmann) utilisé à la vitesse maximale pendant 5 minutes. Ce mélange a été centrifugé à 16 000 x g pendant 15 minutes dans une micro-centrifugeuse

de type IEC Micromax. L'extraction de l'ADN a été faite premièrement avec une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (50 :49 :1) et deuxièmement avec une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1). Au surnageant nettoyé, une solution d'acétate d'ammonium a été ajoutée à raison d'une concentration finale de 2 M et ce dernier a été gardé sur la glace pendant 30 minutes. Le surnageant a été ensuite centrifugé à 16 000 x g pendant 15 minutes.

L'ADN récupéré dans le surnageant a été par la suite purifié sur une colonne de gel G-200 Séphadex (Pharmacia, Baie d'Urfée, Canada) contenu dans une seringue de 5 mL équilibré avec du tampon TE (10 mM Tris-HCl à pH 8,0 et 1 mM EDTA). Des fractions de 500 µL ont été récoltées et 20 µL de chacunes des fractions ont été utilisées pour évaluer, sur un gel d'agarose, l'ADN extrait et déterminer dans laquelle des fractions il se trouvait. L'ADN a été précipité avec une solution 3 M d'acétate de sodium (1/10 du volume) et deux volumes d'alcool 70 % (v/v). Le précipité a été resuspendu dans 100 µL d'eau stérile. Lors d'un deuxième essai, pour purifier d'avantage, une autre colonne de purification contenant du polyvinylpolypyrollidone (PVPP, America Chemical Ltd, Montréal) a été utilisée car elle donnait de meilleurs résultats. Les mêmes procédures ont été suivies pour l'extraction de l'ADN sauf qu'il a été resuspendu dans 200 µL d'eau stérile après la dernière précipitation. Une colonne de PVPP a été préparée dans une seringue de 1 mL. Le contenu de la colonne a été asséché à 3 000 rpm dans une centrifugeuse de type Damon/IEC Division pendant 2 minutes pour se débarrasser du tampon. Lorsque les colonnes ont été prêtes, les échantillons ont été disposés à la surface du gel et elles ont été centrifugées à 3 000 rpm pendant 2 minutes. L'échantillon purifié a été par la suite précipité avec une solution de 0,3 M d'acétate de sodium (1/10 du volume) et deux volumes d'alcool 70 % ont été ajoutés. Le mélange a été incubé à –70°C pendant 30 minutes et a été par la suite centrifugé à 16 000 x g pendant 10 minutes. Le précipité a été séché complètement et resuspendu dans 30 µL d'eau stérile.

5.3.2 Quantification de l'ADN

Un gel de 1 % (0,5 g d'agarose dans 50 mL de TAE 1X) a été préparé pour évaluer la concentration de l'ADN génomique microbien totale du sol, des boues et des microcosmes avec ou sans boues biologiques. La quantification a été effectuée par rapport à des concentrations connues d'ADN. La migration de l'ADN a été effectuée sur un gel dans une chambre à électrophorèse et la coloration du gel a été faite à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL). Pour révéler l'ADN, le gel a été exposé aux rayons U.V. en utilisant le Gel Doc 1000 (Bio-Rad).

5.3.3 Amplification par PCR

La concentration microbienne du sol, des boues et des microcosmes dégradant les HAP et les alcanes a été évaluée qualitativement par l'amplification par PCR. Pour ce faire, les gènes de dégradation ont été détectés par des amorces spécifiques. Les séquences consensus des oligonucléotides utilisés pour détecter les gènes de dégradation des HAP, ont été déduites grâce à l'alignement entre des séquences génétiques d'opérons déjà connues dont *hap*, *nah* et *dox* (Simon *et al.*, 1993 ; Denome *et al.*, 1993). Les amorces qui ont été utilisées sont FerEco et FerBam (Dagher *et al.*, 1996) pour révéler les gènes de dégradation des HAP et *alc*G et *alc*D pour les alcanes. Des amorces universelles pA et pH provenant des gènes de l'ARN ribosomal 16S d'eubactéries ont été utilisées pour vérifier la présence d'ADN. L'amorce pA possède la séquence suivante : 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (localisée à la position 8-27 de la séquence de l'ARN ribosomal de *E. coli*) tandis que celle de l'amorce pH (1522-1541) est : 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' (Bruce *et al.*, 1992). Les oligonucléotides ont été synthétisés à l'aide d'un Gene Assembler (Pharmacia, Baie d'Urfée).

L'amplification par PCR a été accomplie dans un volume de réaction de 50 µL contenant 10 mM Tris-HCl pH 9,0, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl , 200 µM dNTP, 10 pmole de chacune des amorces et 2,5 U de l'ADN polymérase *Taq* (Pharmacia). Les amplifications ont été effectuées avec un appareil DNA thermal cycler 480 (Perkin-

Elmer). Le programme consistait à introduire l'ADN à amplifier à raison de 50 à 100 ng, à 80 °C. Tous les échantillons devaient être complétés en 3 minutes ou moins soit le contrôle négatif (seulement les réactifs), le contrôle positif (avec de l'ADN sur lequel les gènes d'intérêt étaient obligatoirement présents) et les différents échantillons à tester provenant soit du sol, des boues biologiques ou des microcosmes avec et sans boues. Par la suite, la température montait à 94 °C et y restait pendant 5 minutes et puis redescendait à 55 °C pendant 5 minutes. Par la suite la température remontait à 72 °C pendant 2 minutes. Ce cycle de température a été répété 30 à 35 fois et finalement, le tout se termine par une période d'extension de 10 minutes à 72 °C et est conservé à 25 °C. Les produits de l'amplification ont été examinés sur un gel d'agarose de 1 % (p/v). Les deux types de fragments amplifiés, soit pour les HAP, soit pour les alcanes, avaient une longueur approximative de 300 paires de bases.

6. MINÉRALISATION

Les expériences de minéralisation ont été effectuées de la même façon que celles utilisées avec les microcosmes sauf que des bouteilles sérologiques de 100 mL ont été utilisées. Les bouteilles contenaient 10 g de sol et environ 6 mL de boues biologiques ou d'eau. Chaque bouteille était fermée hermétiquement avec des bouchons en téflon. La minéralisation de l'hexadécane et du phénanthrène a été effectuée séparément, c'est à dire dans des cultures différentes. L'alcane ou le HAP non radioactif correspondant a été ajouté pour obtenir 100 ppm (mg/L) d'une solution-mère de 1 000 ppm, soit une dilution 1/10. En ce qui concerne la solution-mère d'hexadécane, 100 mg de ce composé ont été dissout dans 100 mL d'hexane. Pour le phénanthrène, la solution a été préparée de façon similaire sauf que l'éther a été utilisé comme solvant. Le composé radioactif, soit le 9-^{14}C-phénanthrène (8,3 mCi/mmol) ou le ^{14}C-hexadécane (2,6 mCi/mmol) (Sigma, St-Louis), a été ajouté à 10 mL de la solution-mère contenant le composé non radioactif correspondant. Ces nouvelles solutions ont été ajoutées à des bouteilles contenant 10 g de sol pour obtenir 110 000 cpm. Puis le solvant a été évaporé à la température de la pièce pendant une période de 48 hrs. Quand le solvant a été entièrement évaporé, 4 mL soit de boues biologiques, soit d'eau, soit des solutions d'azote, soit du filtrat ou des boues

autoclavées ont été ajoutées aux bouteilles. Des contrôles abiotiques ont été effectués pour évaluer de façon précise la minéralisation résultant de l'activité microbienne. Ces cultures sont identiques aux cultures biotiques sauf que 1 mL de chlorure de mercure d'une solution mère de 10 M a été ajouté par bouteille. Pour chacune des bouteilles, un duplicata a été réalisé. Dans chacune des bouteilles une trappe à CO_2, constituée d'un tube contenant 1 mL de KOH 1M (Anachemia), a été déposée et les bouteilles ont été scellées. Les bouteilles sérologiques ont été incubées à la température de la pièce, en absence de lumière et, selon les expériences, agitées ou non 5 minutes par jour. De plus, une fois par semaine de l'oxygène a été injecté dans les bouteilles pour maintenir des conditions aérobies de sorte que ce facteur ne soit pas limitant pour la croissance microbienne.

Après différentes périodes d'incubation, tout le KOH du tube a été prélevé à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille stérile. Le volume total, soit 1 mL, a été transféré dans un vial à scintillation. Un volume égal de KOH frais a été ajouté dans le tube dans le but de rincer celui-ci. Ce nouveau volume a été combiné au premier et 5 mL de liquide à scintillation Ultima Gold TM XR (Packard Instrument, Meriden) ont été ajoutés au vial. Les résultats de la radioactivité ont été obtenus à l'aide d'un compteur à scintillation modèle 3375 (Packard, USA). Les valeurs ont été par la suite exprimées en coups par minute ^{14}C ($cpm^{14}C$) à l'aide d'une courbe standard.

Des cultures similaires mais ne contenant pas de composés radioactifs ont aussi été effectuées en parallèle afin d'évaluer la concentration résiduelle des hydrocarbures. Ces cultures ont été incubées dans les mêmes conditions que les cultures radioactives. Elles ont été extraites selon la méthode d'extraction des microcosmes sauf que le volume final a été de 25 mL. Des contrôles abiotiques pour chacune des cultures appropriées ont été effectués pour évaluer les pertes par volatilisation.

RÉSULTATS

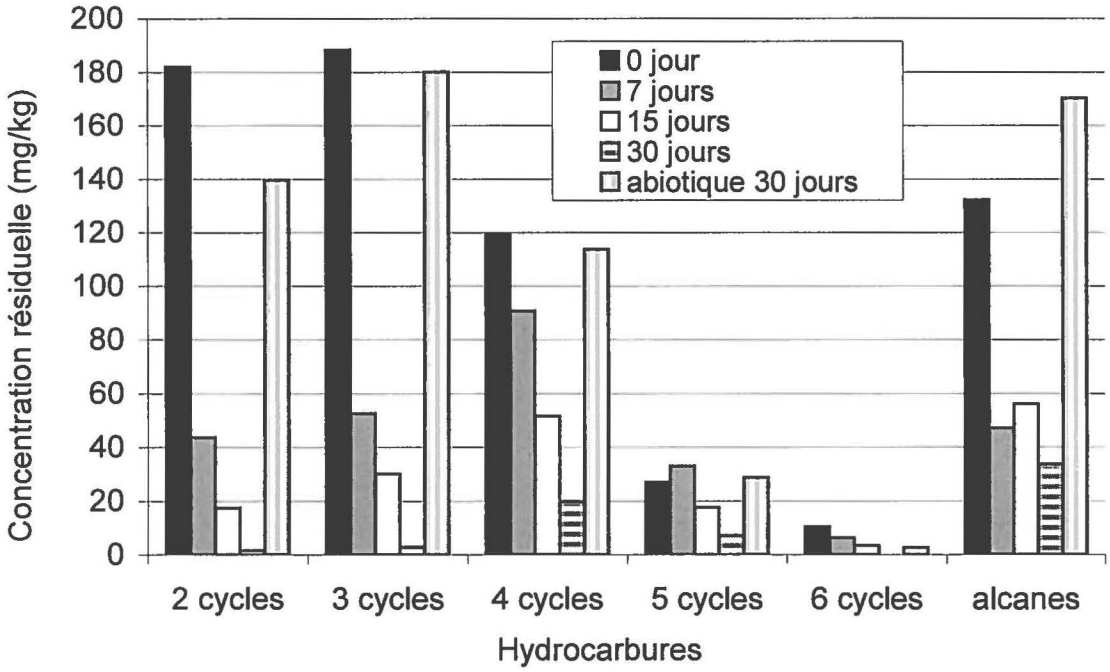
1. ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DES HYDROCARBURES

1.1 Dégradation des HAP et alcanes

L'effet d'une bioaugmentation par des boues biologiques sur la dégradation des hydrocarbures (HAP, alcanes et C_{10}-C_{50}) dans un sol contaminé a été étudié dans des microcosmes en fonction du temps d'incubation et à la température de la pièce. Les microcosmes addionnés d'eau étaient nos contrôles positifs. La dégradation des hydrocarbures pétroliers a été accélérée dans les microcosmes additionnés de 0,07 % (p/p base sèche) de boues biologiques, par rapport à ceux qui n'ont reçu que de l'eau (Figure 7). Après seulement 7 jours, une disparition de 76 et 72 % des HAP à deux et trois cycles, respectivement, a été observée dans les microcosmes avec boues alors que dans les microcosmes sans boues ces pourcentages ont été de 8 et 0 % (non significatif). Finalement, après 30 jours d'incubation la disparition des HAP à deux et trois cycles, dans les microcosmes en présence de boues, était d'environ 99 % dans les deux cas, en comparaison à 76 et 64 %, respectivement, pour les microcosmes sans boues. Une réduction de l'ordre de 83 % des HAP à quatre cycles a été observée au niveau des microcosmes avec boues après 30 jours d'incubation, alors qu'en absence de boues, il n'y a eu aucune réduction de ces HAP. Pour les HAP de cinq et six cycles, il est difficile d'évaluer leur dégradation compte tenu de leur faible concentration dans le sol. Des résultats similaires aux HAP à quatre cycles ont été obtenus pour les alcanes. C'est-à-dire une diminution de leur concentration d'environ de 75 % après 30 jours d'incubation en présence des boues et aucune dégradation en absence de boues.

Pour s'assurer que la disparition des hydrocarbures dans les différents microcosmes est vraiment attribuable à une biodégradation, des contrôles abiotiques ont été incubés dans les mêmes conditions. Dans ces microcosmes les composés les plus volatils, soit les HAP à deux et trois cycles ont subi des pertes significatives (Figure 7). Une diminution de 23 et 5 % de ces composés, respectivement, a été observée en présence des boues après 30 jours d'incubation, tandis que ces pourcentages étaient de 33 et 29 % en leur absence. En ce qui concerne les alcanes, il n'y a pas eu de pertes puisque les concentrations après 30 jours d'incubation ont été plus élevées que celles du départ

A)



B)

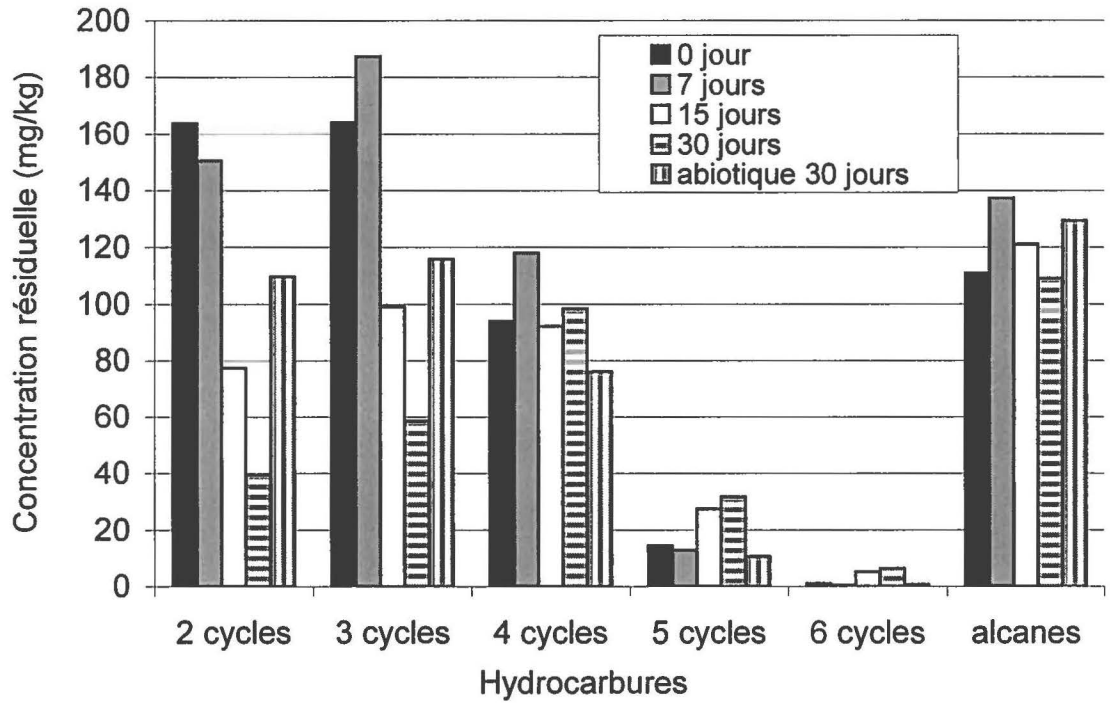


Figure 7: Concentration résiduelle des HAP et des alcanes dans les microcosmes biotique et abiotique additionnés (0,07% p/p) (A) ou non (B) de boues biologiques.

pour les microcosmes avec et sans boues. Lorsque les pertes autres que celles résultant de la biodégradation sont prises en compte, c'est-à-dire en soustrayant la perte des composés au niveau des contrôles abiotiques des valeurs obtenues dans les cultures biotiques, le biotraitement avec les boues biologiques conserve son intérêt. En effet, après 30 jours d'incubation il y a eu dégradation nette de 76 % (99 % - 23 %) et de 94 % (99 % - 5 %) pour les HAP à deux et trois cycles, respectivement, pour seulement 42 % (76 % - 33 %) et 35 % (64 % - 29 %) dans les microcosmes sans boues. Aucune perte abiotique n'a été observée en ce qui concerne les alcanes et les HAP à 4 cycles.

La présentation des résultats précédents a été faite en fonction de la sommation de tous les composés faisant partie des HAP, regroupés selon le nombre de cycles, et les alcanes. L'observation individuelle des polluants permet de constater que certains ont été plus fortement dégradés que d'autres dans un groupe donné (Tableau 10 et 11). Par exemple, pour l'acénaphthalène et le fluorène, des composés à trois cycles, leur concentration est passée de 13 à 0,2 ppm (98 % de dégradation) et 49 à 0,2 ppm (99 %), respectivement, après 30 jours d'incubation dans les microcosmes avec boues. Par contre, dans les microcosmes sans boues, la concentration de ces deux même composés est passée de 8 à 5 ppm (33 %) et 28 à 11 ppm (59 %), respectivement. Le même phénomène a été observé au niveau des alcanes (Tableau 11). Par exemple, dans les microcosmes en présence de boues biologiques, le nonadécane (C19) possédait une concentration de départ de 12 ppm et après 30 jours d'incubation celle-ci se situait à 2 ppm (83 %) alors que la concentration du (C19) est passée de 9 à 12 ppm (aucune dégradation) en absence de boues.

Tous les HAP normés par le MEF ont subi une baisse supérieure à 42 % de leur concentration dans les microcosmes avec boues biologiques après 30 jours d'incubation (Tableau 12). La concentration résiduelle de certains HAP comme le chrysène, le benzo(a)anthracène et le pyrène fait en sorte qu'ils ne sont pas classés dans une plage inférieure après le traitement, en dépit d'une baisse de 91, 82 et 75 %, respectivement.

Tableau 10: Concentration des hydrocarbures aromatiques (mg/kg (poids sec)) en fonction du temps d'incubation dans les microcosmes effectués avec le sol de la sablière Thouin en présence ou non de boues biologiques.

Composés analysés	Jours d'incubation des microcosmes			
	0		30	
	Conc. AB	Conc. SB	Conc. AB	Conc. SB
Produits à deux cycles				
Indène	0,5	0,4	0,4	1,8
Naphthalène	28,4	25,3	n.d.	0,9
2-Méthylnaphthalène	17,3	15,4	n.d.	3,5
1-Méthylnaphthalène	33,9	30,3	n.d.	2,3
2,7-Diméthylnaphthalène	10,5	8,9	n.d.	2,7
1,3-Diméthylnaphthalène	22,5	19,9	n.d.	5,4
1,6-Diméthylnaphthalène	12,2	9,1	n.d.	3,3
2-Vinylnaphthalène	n.d.	0,9	n.d.	n.d.
Acénaphthylène	42,6	34,7	0,1	10,4
3-phényltoluène	1,1	0,6	0,1	0,1
Trans-stilbène	12,9	18,4	0,9	9,2
somme deux cycles	181,9	163,7	1,5	39,6
Produits à trois cycles				
Acénaphthène	12,6	8,2	0,2	5,5
Fluorène	48,5	28,1	0,2	11,4
1-Méthylfluorène	26,3	44,0	1,3	17,1
Phénanthrène	70,9	70,1	0,8	8,3
Anthracène	16,3	4,4	0,1	11,8
4h-Cyclopenta[def]-phénanthrène	13,8	13,1	0,3	4,4
somme trois cycles	188,3	167,9	2,8	58,5

Conc. AB: Concentration des microcosmes avec boues
Conc. SB: Concentration des microcosmes sans boues
n.d.: non détecté

Tableau 10 (suite): Concentration des hydrocarbures aromatiques (mg/kg (poids sec)) en fonction du temps d'incubation dans le microcosmes effectués avec le sol de la sablière Thou en présence ou non de boues biologiques.

Composés analysés	Jours d'incubation des microcosmes			
	0		30	
	Conc. AB	Conc. SB	Conc. AB	Conc. SB
Produits à 4 cycles				
Fluoranthène	22,9	19,4	3,2	23,9
Pyrène	50,1	42,0	12,6	42,1
Benzo(a)anthracène	10,8	6,5	1,9	14,0
Chrysène	21,6	13,0	1,9	14,0
somme quatre cycles	119,1	94,0	19,8	98,4
Produits à 5 cycles				
Benzo(b)fluoranthène	8,5	3,9	1,4	6,9
Benzo(k)fluoranthène	4,2	1,9	1,4	6,9
Benzo(a)pyrène	14,3	8,5	4,4	17,8
somme cinq cycles	27,0	14,3	7,2	31,7
Produits à 6 cycles				
Indo(1,2,3-cd)pyrène	4,1	0,2	n.d.	2,4
Dibenz(ah)anthracène	2,4	0,5	n.d.	1,4
Benzo(ghi)pérylène	4,1	0,2	n.d.	2,4
somme six cycles	10,5	1,0	0,0	6,3
HAPs totaux	527	440	31	235

Conc. AB: Concentration des microcosmes avec boues
Conc. SB: Concentration des microcosmes sans boues
n.d.: non détecté

Tableau 11: Concentration des alcanes (mg/kg (poids sec)) en fonction du temps d'incubation dans les microcosmes effectués avec le sol de la sablière Thouin en présence ou non de boues biologiques

	Jours d'incubation des microcosmes			
	0		30	
Alcanes	Conc. AB	Conc. SB	Conc. AB	Conc. SB
Tridécane	2,1	1,0	1,0	1,9
Tétradécane	6,2	3,9	1,3	6,7
Pentadécane	6,3	4,1	2,1	7,0
Sommes C13-C15	**14,6**	**9,0**	**4,4**	**15,6**
Hexadécane	8,0	10,2	3,3	11,4
Heptadécane	8,3	8,2	2,3	14,4
Octadécane	11,6	10,6	2,9	14,6
Sommes C16-C18	**27,9**	**29,0**	**8,5**	**40,4**
Nonadécane	12,2	8,8	1,7	12,3
Eicosane	11,7	11,6	2,8	14,6
Uncosane	11,2	11,0	2,9	14,1
Sommes C19-C21	**35,1**	**31,4**	**7,4**	**41,0**
Docosane	11,0	9,5	3,6	13,1
Tricosane	9,5	7,9	1,9	11,4
Tétracosane	7,8	6,6	2,0	12,1
Sommes C22-C24	**28,3**	**24,0**	**7,5**	**36,6**
Pentacosane	6,5	4,7	1,9	9,5
Hexacosane	5,1	3,8	1,0	8,3
Heptacosane	4,8	3,4	1,3	5,0
Sommes C25-C27	**16,4**	**11,9**	**4,2**	**22,8**
Octacosane	4,5	2,8	1,1	7,1
Nocosane	3,2	2,9	0,5	5,8
Sommes C28-C29	**7,7**	**5,7**	**1,6**	**12,9**
Alcanes totaux	**130**	**111**	**34**	**169**

Conc. AB: Concentration des microcosmes avec boues
Conc. SB: Concentration des microcosmes sans boues
n.d.: non détecté

Tableau 12: Concentration des HAP normalisés par le MEF en fonction du temps d'incubation dans des microcosmes avec boues biologiques.

HAP normés	Jours d'incubation des microcosmes avec boues biologiques (critère). 0 Conc. AB	30 Conc. AB	Pourcentage de réduction.
Acénaphthène	12,6 (C)	0,2 (B)	98
Naphthalène	28,4 (C)	n.d. (A)	100
Acénaphthylène	42,6 (C)	0,1 (A)	99,8
Anthracène	16,3 (C)	0,1 (A)	99,4
Fluorène	48,5 (C)	0,2 (B)	99,6
Phénanthrène	70,9 (C)	0,8 (B)	98,9
Benzo(a)anthracène	10,8 (C)	1,9 (C)	82
Chrysène	21,6 (C)	1,9 (C)	91
Pyrène	50,1 (B)	12,6 (B)	75
Fluoranthène	22,9 (C)	3,2 (B)	86
Benzo(b)fluoranthène	8,5 (B)	1,4 (B)	84
Benzo(k)fluoranthène	4,2 (B)	1,4 (B)	67
Benzo(a)pyrène	14,3 (C)	4,4 (C)	69
Benzo(ghi)pérylène	4,1 (B)	n.d (A)	100
Dibenz(ah)anthracène	2,4 (B)	1,4 (B)	42
Indo(1,2,3-cd)pyrène	4,1 (B)	n.d (A).	100

Conc. AB: Concentration des microcosmes avec boues
n.d.: non détecté

Respectivemetn. Par contre, la concentration de HAP tel que l'anthracène et l'acénaphthylène est passée d'une plage >C au critère A, pour un enlèvement de 99 %, respectivement. D'autres, comme le phénanthrène, sont passés de la plage > C à la plage A-B, avec un taux d'enlèvement de 99 %.

1.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}

Les hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} ont aussi été suivis dans les différents microcosmes avec et sans boues. Pour ces composés, le critère B se situe à 750 ppm et à 3500 ppm pour le critère C. Les microcosmes n'ayant pas reçu de boues se situaient au point de départ, à une concentration voisine du critère C (Figure 10). L'addition de boues biologiques double la concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} au niveau des microcosmes. Les microcosmes avec boues biologiques possèdent une concentration d'hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} de 7958 ppm au départ, tandis que les microcosmes sans boues sont à 4217 ppm. Les microcosmes additionnés de boues ont subi une diminution rapide de la concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} après seulement 7 jours d'incubation. Le contrôle abiotique correspondant a subi une chute similaire, puis la concentration d'hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} est restée voisine du critère C jusqu'à la fin de l'expérience (résultats non présentés). Par contre, la concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} dans les microcosmes avec boues a continué à diminuer pour atteindre un plateau à 1714 ppm après 30 jours d'incubation. Pour les microcosmes sans boues, une diminution de 28 % (4217 à 3031 ppm) des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} a été observée après 30 jours d'incubation comparativement à 79 % (7958 à 1714 ppm) en présence de boues. À la fin de l'expérience, la concentration en hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} des cultures avec boues se situait dans la partie inférieure de la plage B-C, tandis qu'en absence de celles-ci, elle était légèrement inférieure au critère C.

1.3 Minéralisation

1.3.1 Phénanthrène

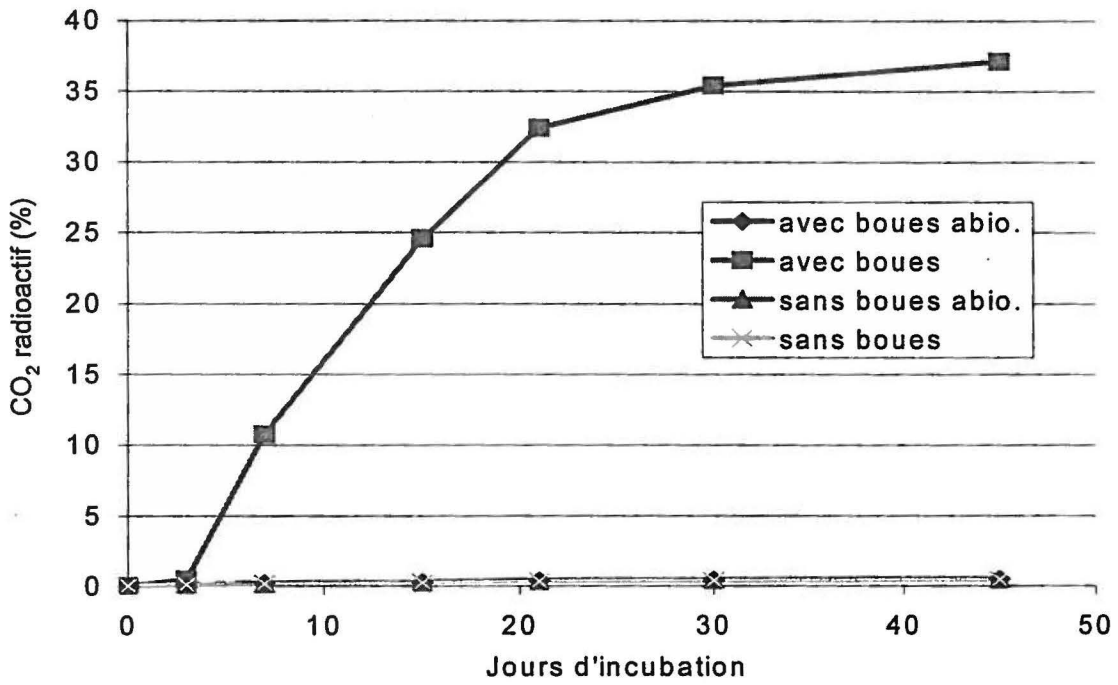
Pour évaluer l'efficacité du traitement, le phénanthrène a été choisi comme composé représentatif de la contamination des HAP retrouvés au niveau du sol. Les expériences de minéralisation ont été effectuées dans des bouteilles sérologiques en présence ou en absence de boues biologiques avec le lot de sol peu contaminé provenant de la sablière Thouin. Après la première série d'expériences, les bouteilles ont été agitées, ce qui nous a permis d'augmenter la minéralisation de 10 fois, soit de 4 à 37% de CO_2 marqué (résultats non présentés).

La minéralisation du phénanthrène a été très forte dans les cultures qui ont reçu des boues biologiques. Le CO_2 radioactif récupéré a augmenté de façon importante pendant la période d'incubation de 45 jours, ainsi que démontré par des comptes de scintillation qui sont passés de 70 (temps 0) à 55 729 cpm. Le pourcentage maximum de CO_2 radioactif formé à partir du phénanthrène marqué a été de 37 % (Figure 8A). Après 3 jours d'incubation, une accélération rapide de la minéralisation a été observée pour atteindre un plateau après 30 jours d'incubation. Dans les cultures qui n'ont pas reçu de boues biologiques, tout comme dans les cultures abiotiques, il n'y a pas eu de minéralisation significative. Dans cette expérience, la dégradation du phénanthrène au niveau des cultures avec boues biologiques a été de 92 % après 45 jours d'incubation et de seulement 24 % dans les cultures ayant reçu de l'eau (résultats non présentés).

1.3.2. Hexadécane

L'hexadécane radioactif a aussi été utilisé pour la minéralisation, étant donné qu'il est un représentant de la contamination des alcanes dans le sol. La transformation de l'hexadécane marqué en CO_2 radioactif après 45 jours d'incubation a été plus importante au niveau des cultures avec boues biologiques, soit de 12 276 cpm comparativement à 686 cpm en absence de boues (Figure 8 B). Onze pour-cent de CO_2 radioactif a été formé après 45 jours d'incubation. Les contrôles abiotiques des cultures avec et sans boues

A)



B)

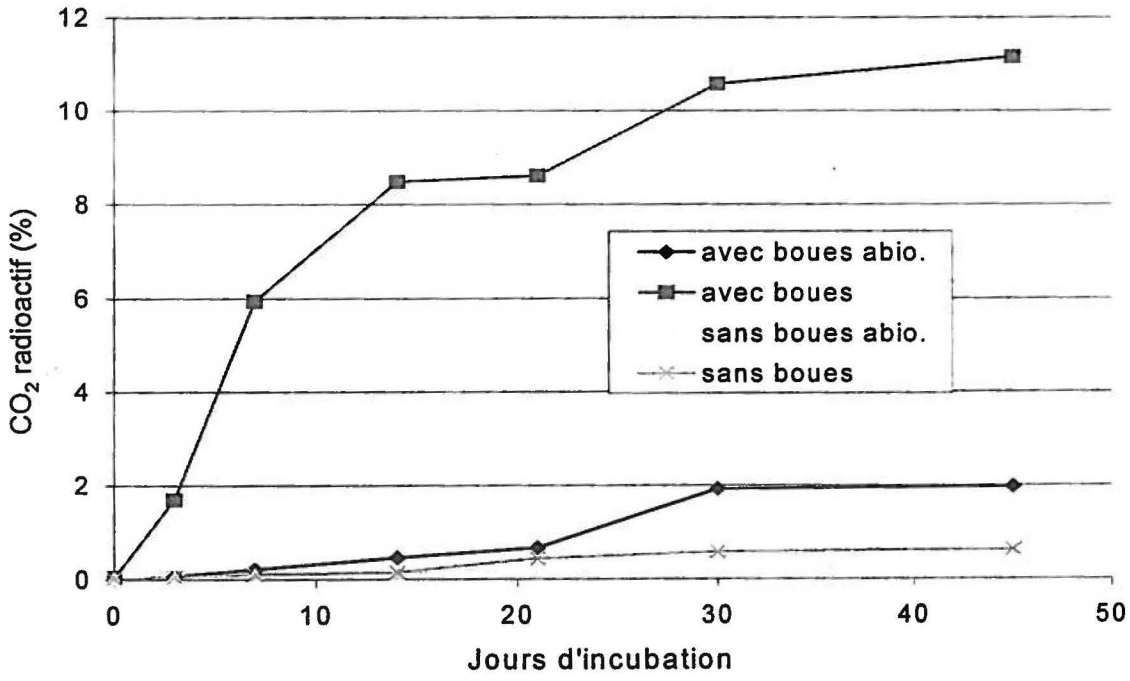


Figure 8 : Pourcentage de CO_2 radioactif formé dans des microcosmes avec ou sans boues et leur contrôle abiotique (abio.) approprié en présence de phénanthrène (A) et d'hexadécane (B) marqué.

n'ont jamais produit plus de 0,5 % de CO_2 radioactif. La minéralisation dans les cultures biotiques avec boues a été au même niveau que celle des cultures n'ayant reçu que de l'eau pendant les 20 premiers jours. La minéralisation a par la suite faiblement augmentée pour atteindre un plateau de 2 % après une période de 30 jours.

La dégradation de l'hexadécane des contrôles positifs en présence de boues a été de 81 % après 30 jours d'incubation (résultats non présentés). Par contre, dans les cultures en absence de boues, elle a atteint un maximum de 26 % après la même période d'incubation. Lors d'une seconde expérience, des résultats semblables ont été obtenus.

2. FACTEURS PROVENANT DES BOUES STIMULANT LA DÉGRADATION DES HYDROCARBURES

2.1 Azote

2.1.1 Dégradation des HAP et alcanes

Pour identifier l'élément contenu dans les boues biologiques qui permet l'accélération de la dégradation des hydrocarbures du sol de la sablière Thouin, nous avons ajouté au sol une source d'azote à la place des boues. De l'azote sous forme d'urée (organique) ou sous forme de nitrate d'ammonium (inorganique) a été ajouté au sol en concentration équivalente à celle contenue dans les boues biologiques, soit de 1,3 mM. La comparaison des résultats obtenus pour les divers composés étudiés a été faite après 15 jours d'incubation, car la différence entre les microcosmes avec et sans boues était beaucoup plus grande à ce moment. Les résultats obtenus pour les divers microcosmes permettent de mettre en évidence l'avantage de l'apport des boues biologiques sur la dégradation des alcanes par rapport à un microcosme sans boues ou additionné d'azote (Figure 9 A). Dans les microcosmes avec boues, après 15 jours d'incubation, une concentration totale d'alcanes (C13-29) se situant en dessous de 60 ppm a été retrouvée. Par contre, pour les microcosmes sans boues cette concentration a été de 120 ppm. De façon générale, le fait de remplacer les boues biologiques par une source d'azote n'a pas permis un enlèvement aussi important des alcanes. La concentration résiduelle des

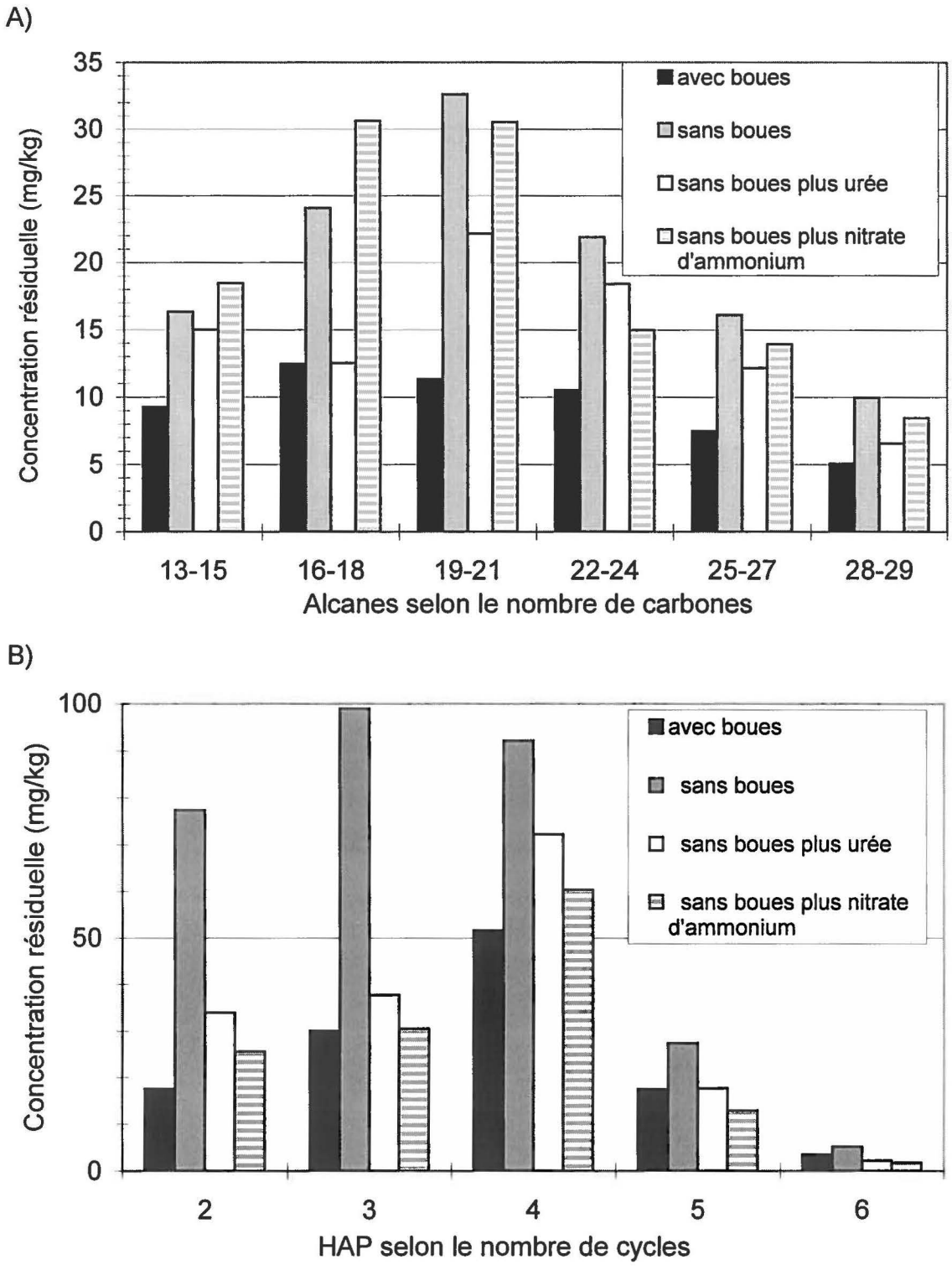


Figure 9: Effet de l'ajout d'azote aux microcosmes sur la dégradation des alcanes (A) et des HAP (B) après 15 jours d'incubation.

alcanes dans les microcosmes additionnés d'azote a généralement été plus près de celle des microcosmes en absence de boues qu'en leur présence. L'ajout d'urée n'a pas stimulé la dégradation des alcanes sauf pour ceux de C16-18 et C19-21. Comparativement à l'urée, le nitrate d'ammonium a eu un effet similaire à celui observé en absence des boues sauf pour les alcanes de C22-24.

Les microcosmes additionnés de boues biologiques ou d'azote ont démontré une efficacité supérieure au niveau de l'élimination des HAP par rapport à ceux n'ayant pas reçu de boues (Figure 9 B). La concentration résiduelle de l'ensemble des HAP mesurés après 15 jours d'incubation a été de 120, 300, 164 et 131 ppm dans les microcosmes avec boues, sans boues, avec urée et avec nitrate d'ammonium, respectivement. En pourcentage ceci correspond à 65, 3, 45 et 50 % d'enlèvement. Contrairement à ce qui a généralement été observé pour les alcanes, l'addition d'azote a favorisé la dégradation des HAP. Comme il a été mentionné précédemment, la disparition des HAP à cinq et six cycles est difficile à apprécier compte tenu de leur faible concentration.

2.1.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}

Les concentrations résiduelles en hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} dans les microcosmes biotiques avec urée ou nitrate d'ammonium, après 30 jours d'incubation, ont été similaires (2595 et 2909 ppm, respectivement) à celles obtenues dans les microcosmes sans boues biologiques (3031 ppm), tandis que les microcosmes avec boues ont atteint 1714 ppm (Figure 10). Dans tous les microcosmes abiotiques (résultats non présentés), il n'y a pas eu d'enlèvement significatif des C_{10} à C_{50} de sorte qu'après 30 jours d'incubation il restait 3856 ppm. L'ajout d'urée a permis une diminution de la concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} de 23 %, soit de 3375 à 2595 ppm. Tandis qu'une dégradation de 14 % a été observée, après 30 jours, avec l'addition de nitrate d'ammonium, soit une valeur résiduelle de 2909 ppm. Cette valeur est inférieure de 122 ppm à celle obtenue pour les microcosmes sans boues.

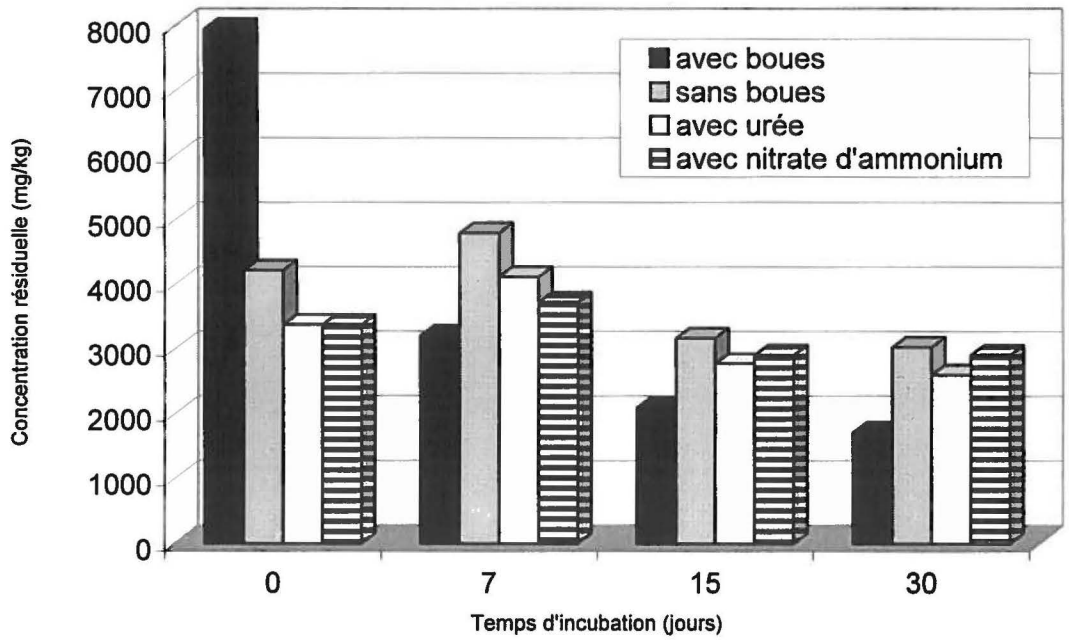


Figure 10: Concentration résiduelle des hydrocarbures pétroliers C10 à C50 dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par de l'urée ou du nitrate d'ammonium en fonction du temps d'incubation.

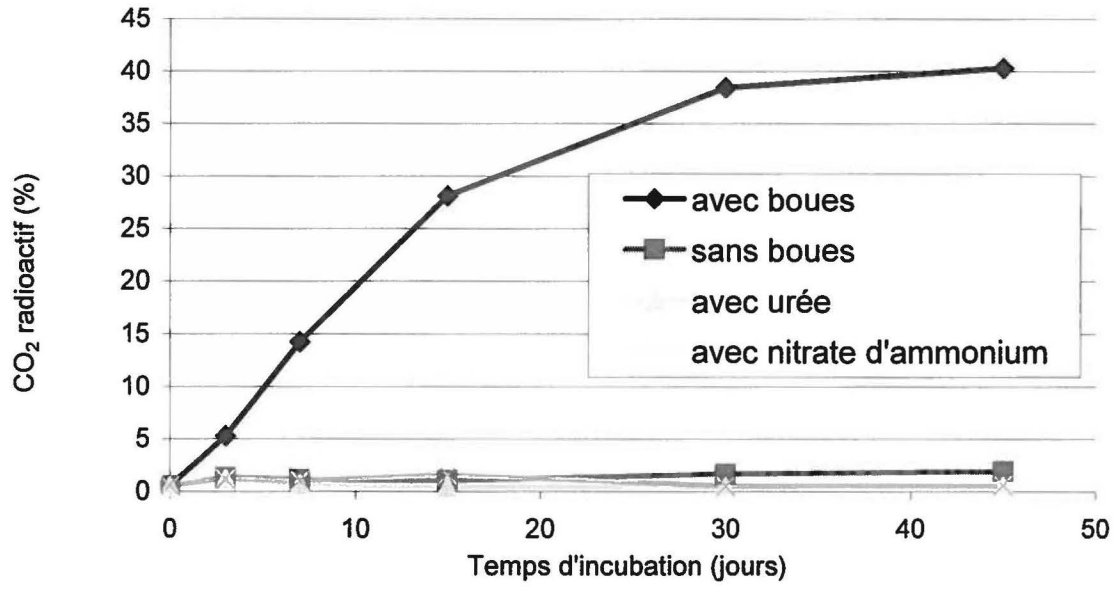


Figure 11: Pourcentage de CO_2 radioactif formé dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par de l'azote en fonction du temps d'incubation en présence de phénanthrène marqué.

2.1.3 Minéralisation

L'effet de l'azote sur la minéralisation du phénanthrène a été étudié au niveau de cultures biotiques et abiotiques (résultats non présentés), dans lesquelles les boues biologiques ont été remplacées par de l'urée ou du nitrate d'ammonium. Des contrôles positifs ont été effectués pour analyser l'effet de cette substitution sur la dégradation du phénanthrène.

Après 30 jours d'incubation, les cultures avec boues ont démontré une très forte capacité à minéraliser le phénanthrène comme ce fut le cas lors de l'expérience précédente (Figure 11). La production de CO_2 radioactif a rapidement augmenté pour finalement atteindre un maximum de 40 % après 45 jours d'incubation. L'ajout d'urée ou de nitrate d'ammonium, à la place des boues, a entraîné la formation d'un pourcentage de CO_2 radioactif très faible, soit 1 %. Dans les cultures ayant reçu ces deux types d'azote la minéralisation est non significative tout comme dans leur contrôle et les cultures en absence de boues. Contrairement à la minéralisation, l'enlèvement du phénanthrène dans les bouteilles ayant reçu de l'urée ou du nitrate d'ammonium est beaucoup plus importante que dans celle n'ayant pas reçu de boues (résultats non présentés). La dégradation est respectivement de 93 % en présence d'urée, de 76 % en présence de nitrate d'ammonium et de 24 % en présence d'eau après 30 jours d'incubation.

2.2. Microorganismes

2.2.1 Dégradation des HAP et alcanes

Comme l'azote ne semble pas être le seul facteur des boues biologiques impliqué dans l'amélioration de la dégradation des hydrocarbures, nous avons donc vérifié l'effet des microorganismes des boues biologiques sur la dégradation des hydrocarbures. Pour ce faire, des microcosmes ont été effectués en ajoutant soit des boues autoclavées, soit du filtrat de boues au sol de la sablière Thouin. La stérilité des deux types de boues traitées a été confirmée sur des milieux PCA.

La teneur en azote total et en nitrites/nitrates sur base solide (p/p) du filtrat de boues et des boues autoclavées a été analysée pour s'assurer qu'elle était semblable à celles des boues non traitées. Les divers procédés utilisés pour l'élimination des microorganismes n'ont pas occasionné de changements au niveau de la teneur (p/p) en azote des boues biologiques (résultats non présentés). Cependant, même si la concentration en azote semble similaire, la filtration a contribué à éliminer certains composés insolubles, comme des matières organiques et inorganiques, etc.

L'élimination des microorganismes des boues biologiques a eu un impact direct sur la dégradation des alcanes après 15 jours d'incubation (Figure 12 A). L'autoclavage a annulé l'effet stimulateur des boues sur l'enlèvement des alcanes de moins de 21 carbones. La filtration des boues a eu un effet similaire mais plus généralisé à l'ensemble des alcanes.

L'élimination des microorganismes des boues biologiques ne semble pas avoir d'effet sur la stimulation de la dégradation des HAP causée par les boues après 15 jours d'incubation (Figure 12 B). En effet l'enlèvement des HAP totaux au niveau des microcosmes avec filtrat de boues et avec des boues autoclavées a été de 70 et 68 %, respectivement, comparativement à 77 % pour les microcosmes en présence de boues non stérilisées. Ceci correspond à une concentration résiduelle respective de 136 et 154 ppm pour les microcosmes avec filtrat de boues et boues autoclavées. Tout comme observé au niveau des HAP totaux, la stérilisation des boues a peu affecté l'effet stimulateur des boues sur l'enlèvement des différents HAP regroupés en fonction de leur nombre de cycles.

2.2.2 Dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}

Les microcosmes avec boues biologiques filtrées ou autoclavées ont été aussi performants que les microcosmes en présence de boues au niveau de la dégradation des

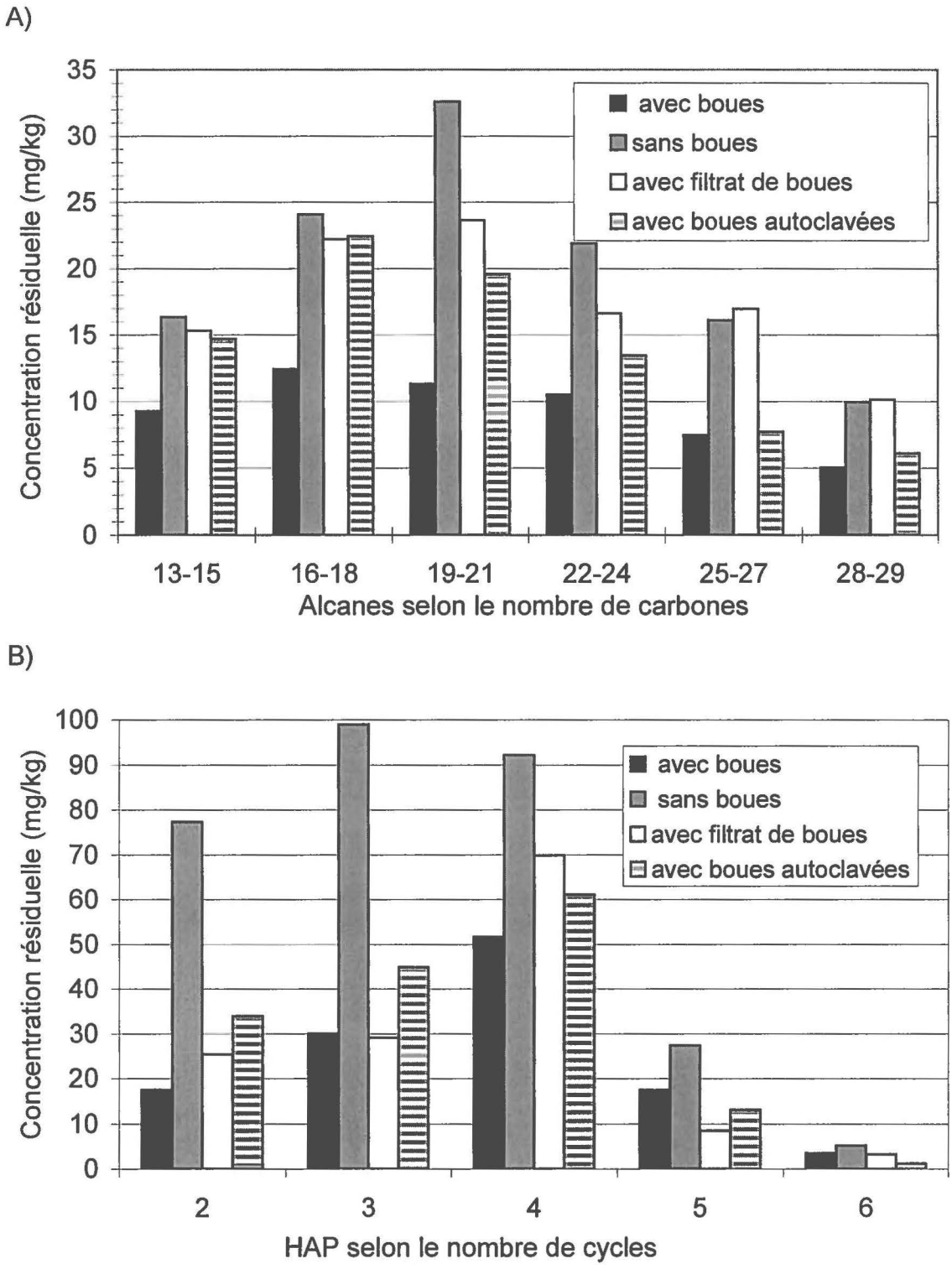


Figure 12: Effet de l'ajout de boues autoclavées ou filtrat de boues sur la dégradation des alcanes (A) et des HAP (B) après 15 jours d'incubation.

hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} (Figure 13). La concentration dans les microcosmes avec boues autoclavées a diminué très rapidement après seulement 7 jours d'incubation. Cette réduction s'est poursuivie jusqu'à 30 jours d'incubation pour atteindre 62 % d'enlèvement, soit de 1610 ppm. La concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} dans ces microcosmes se situe à 104 ppm en dessous de celle dans les microcosmes avec boues. Au niveau des microcosmes avec filtrat de boues la diminution de la concentration des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} a débuté après 7 jours d'incubation. La concentration finale a atteint la plage B-C (2510 ppm), ce qui équivaut à 38 % d'enlèvement, après 30 jours.

2.2.3 Minéralisation

La minéralisation du phénanthrène dans les cultures qui ont reçu du filtrat de boues ou des boues autoclavées, a été non significative, tout comme celle observée pour les cultures en absence de boues (Figure 14). Dans ces cultures, le pourcentage de CO_2 radioactif produit à partir du phénanthrène marqué a été de 1 % après 45 jours d'incubation. La dégradation du phénanthrène au niveau des contrôles positifs a été de 75 % pour les microcosmes avec filtrat de boues et 63 % pour ceux avec des boues autoclavées, après 30 jours d'incubation (résultats non présentés).

2.2.4 Microcosmes avec un sol irradié

Pour vérifier l'importance de la microflore indigène du sol au niveau de la dégradation des HAP, elle a été détruite par irradiation. Le sol le plus contaminé a été utilisé dans cette expérience. Suite à l'irradiation, la stérile a été analysé par un test de croissance sur milieu PCA. Aucune bactérie n'a crû après 15 jours d'incubation à 30 °C.

L'irradiation du sol a entraîné un ralentissement de la dégradation des HAP et des alcanes (Figure 15). La concentration des HAP de deux, trois, quatre et cinq cycles n'a baissé, après 30 jours, que de 33, 27, 0 et 17 ppm, respectivement dans ces microcosmes.

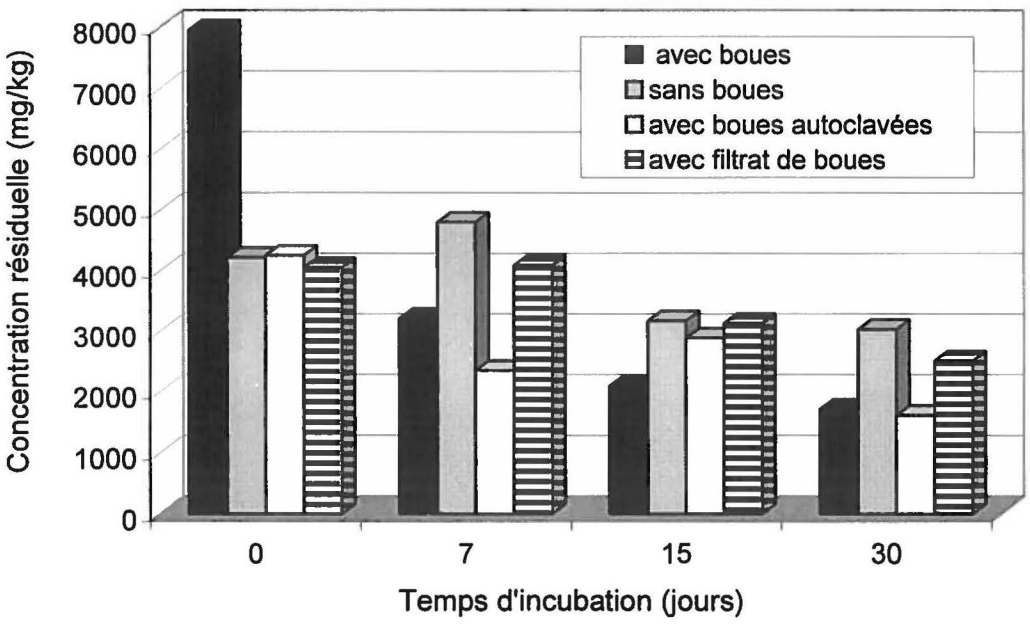


Figure 13: Concentration résiduelle des hydrocarbures pétroliers C10 à C50 dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par du filtrat de boues ou des boues autoclavées en fonction du temps d'incubation.

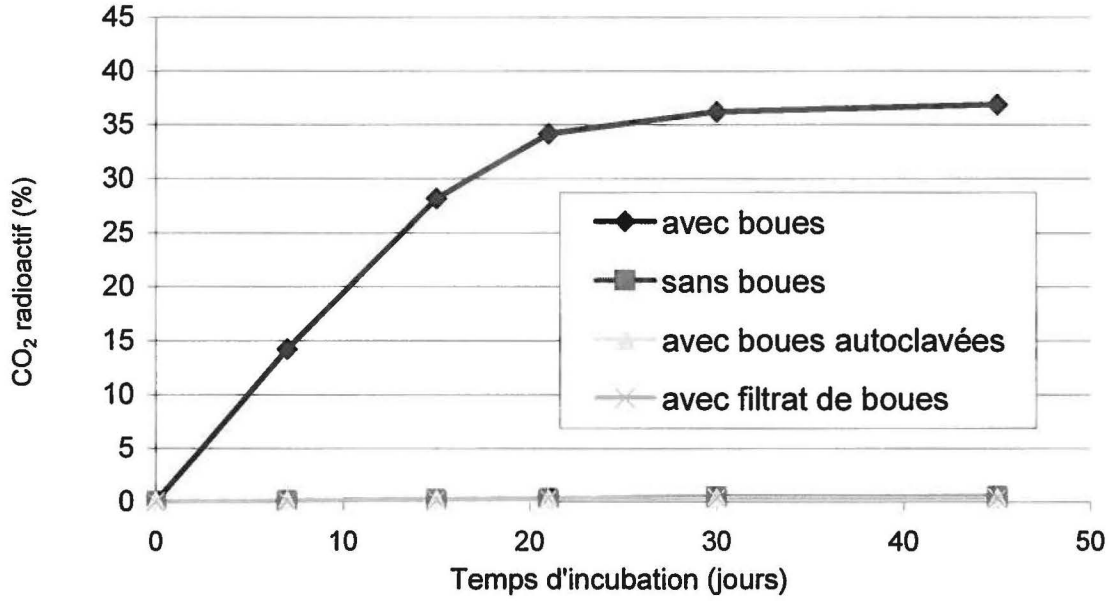


Figure 14: Pourcentage de CO_2 radioactif formé dans des microcosmes avec ou sans boues et dans des microcosmes où les boues ont été remplacées par des boues stérilisées en fonction du temps d'incubation en présence de phénanthrène marqué.

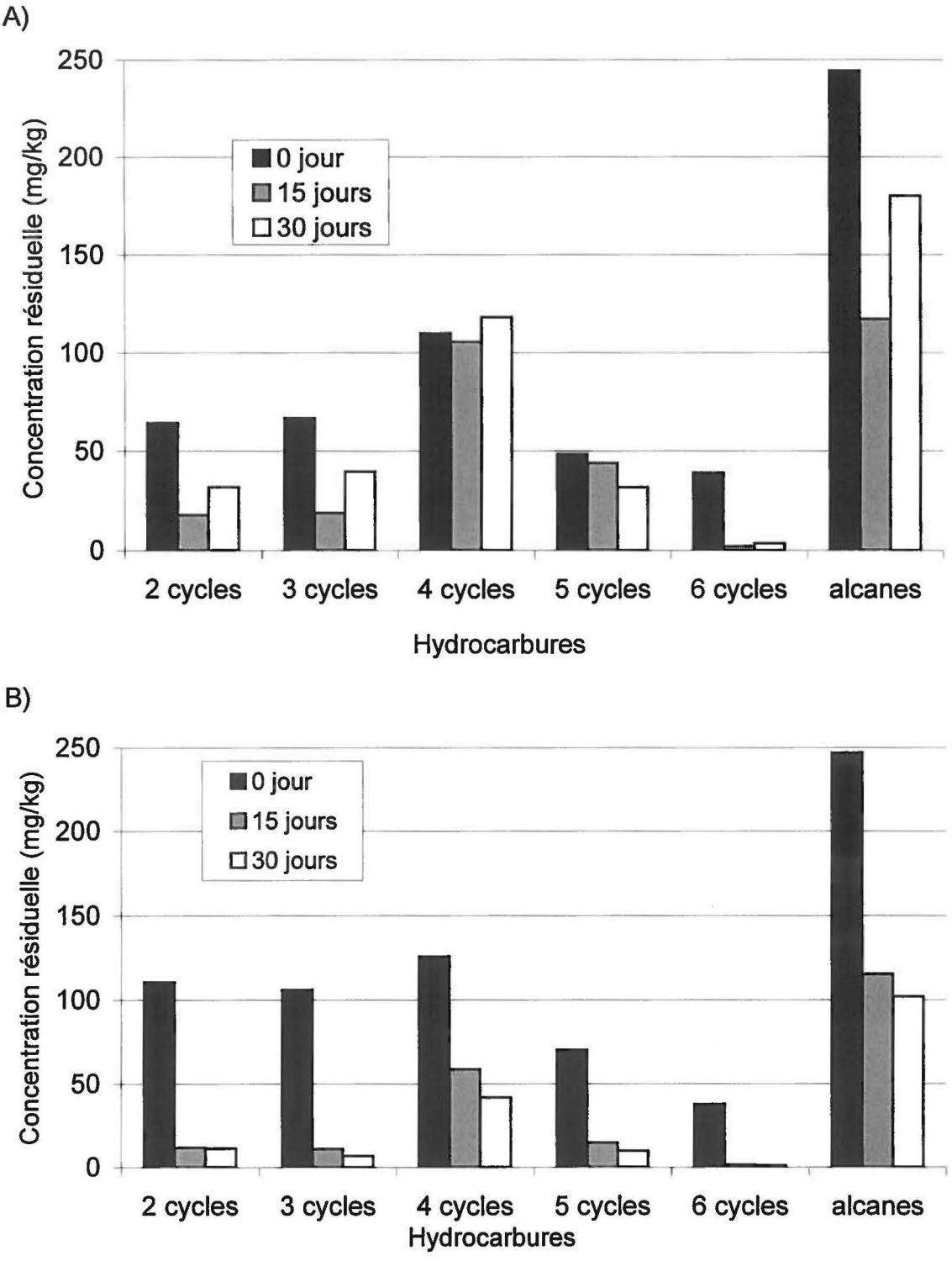


Figure 15: Dégradation des HAP et des alcanes en fonction du temps d'incubation dans des microcosmes avec boues contenant du sol irradié (A) et dans des microcosmes avec boues (B) et un un sol non irradié.

Ces valeurs correspondent à 50, 41, 0 et 34 % d'enlèvement, respectivement, ce qui se compare à 93, 93, 64 et 54 % d'enlèvement, respectivement, dans le microcosme avec le sol non irradié. Dans le cas des alcanes, 65 ppm ont été enlevés après 30 jours d'incubation, ce qui correspond à 26 % de diminution. Cette valeur se compare à 75 % pour les microcosmes avec le sol non irradié. Les contrôles abiotiques ont montré que la concentration résiduelle des différents hydrocarbures était pratiquement inchangée, après 30 jours d'incubation (résultats non présentés).

3. LA FLORE MICROBIENNE

3.1 Dénombrement microbien

3.1.1. Phénanthrène

Trois tests ont été effectués pour caractériser les populations indigènes du sol et des boues biologiques. Le premier fut d'analyser la présence de monooxygénases et de dioxygénases qui fusionnent deux molécules d'indole pour produire un pigment bleu sur milieu TSA. La population bactérienne totale des boues biologiques ajoutés à chacun des microcosmes a été de 6,4 x 10^7 UFC par rapport à 3,9 x 10^8 UFC pour la population bactérienne totale du sol ajouté à chacun des microcosmes (Tableau 13). La population produisant un pigment bleu a été évaluée à 7,5x10^7 UFC dans le sol, tandis qu'elle a été de 5,4x10^6 UFC dans les boues. Pour confirmer ce résultat du phénanthrène a été vaporisé sur les milieux solides. Le principe consistait à vérifier si les colonies ayant produit le pigment bleu dégradaient cet HAP. De l'ensemble des colonies bleues sur le milieu TSA, 20 % de celles-ci étaient incapables de former un halo en présence de phénanthrène (résultats non présentés).

Un autre test a été effectué et ce dernier consistait à vaporiser ce HAP d'intérêt (phénanthrène) sur des populations microbiennes qui se sont préalablement développées sur un milieu solide BHEL. Contrairement au test précédent, la population bactérienne totale a été en nombre plus important au niveau des boues biologiques qu'au niveau du sol. La concentration bactérienne totale était de 3,2x10^8 UFC dans les boues

Tableau 13: Concentration des microorganismes du sol et des boues biologiques dégradant les HAP et les alcanes.

	Sol (bactéries du sol/microcosme)	**Boues (bactéries des boues/microcosme)**
Milieu solide TSA:		
Compte total sur TSA	$3,9 \times 10^8$	$6,4 \times 10^7$
Production d'un pigment bleu (indole)	$7,5 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$
Milieu solide BHEL 0,05%:		
Compte total sur BHEL	$3,5 \times 10^7$	$3,2 \times 10^8$
Formation de halos avec du phénanthrène	$5,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
Milieu liquide BH:		
Nombre le plus probable (phénanthrène)	$1,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$
Nombre le plus probable (hexadécane)	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^8$

Tableau 14: Coloration Gram des souches du sol de la sablière Thouin et des boues biologiques retrouvées dans les cultures en présence de phénanthrène ou d'hexadécane.

Substrat	**Sol de sablière Tho**	**Boues biologiques**
phénanthrène	Gram positif (bâtonn Gram négatif (cocci)	Gram négatif (cocci)
hexadécane	Gram négatif (court bâtonnet) Gram positif (court bâtonnet)	Gram négatif (court bâtonnet) Gram positif (cocci)

comparativement à $3,5x10^7$ UFC dans le sol (Tableau 13). Les populations bactériennes pouvant potentiellement dégrader le phénanthrène ont été plus importantes au niveau du sol que pour les boues, soit de 15 et 8 %, respectivement.

Le dernier test qui a été effectué pour évaluer la concentration totale de microorganismes capables d'utiliser le phénanthrène comme source de carbone et d'énergie a été le nombre le plus probable en milieu BH. L'évaluation de la concentration des microorganismes dégradant ce HAP a été effectuée grâce à l'absence de turbidité dans les contrôles négatifs. Les valeurs obtenues ont été de $1,5x10^6$ bactéries dans le sol/culture et de $1,3x10^4$ bactéries dans les boues/mL. Une coloration Gram a été effectuée pour les populations du sol et des boues (Tableau 14). Il s'est avéré que le sol possédait des populations bactériennes Gram positives et négatives, tandis que les boues ne contenaient que des Gram négatives.

3.1.2. Hexadécane

Le nombre le plus probable de microorganismes pouvant utiliser l'hexadécane a été déterminé en milieu liquide BH. La population microbienne des boues pouvant dégrader l'hexadécane a été de $1,3x10^8$ bactéries dans les boues/mL et de $1,5x10^5$ bactéries dans le sol/g. Une coloration Gram a été effectuée sur les microorganismes du sol et des boues (Tableau 14). Contrairement aux cultures effectuées avec le phénanthrène, des bactéries Gram négatives et positives ont été retrouvées.

3.1.3. PCR

Une autre technique pour suivre les populations microbiennes et la présence des gènes impliqués dans la dégradation est celle de l'amplification par chaîne répétitive (PCR). Grâce à des amorces spécifiques, *FerEco* et *FerBam*, une amplification du gène de la région Ab de l'opéron *nah* a été possible. Le PCR a été effectué sur l'ADN extrait des microorganismes indigènes des deux composantes des microcosmes, soit le sol et les

boues. Un signal au niveau du sol et des boues a révélé la présence de bactéries possédant le gène de dégradation des HAP (résultats non présentés).

Les amorces *alcD* et *alcG* ont aussi été utilisées pour révéler la présence de la voie de dégradation des alcanes. Aucun signal n'a été perçu lors de l'analyse du sol, des boues et des microcosmes en présence ou non de boues. Le PCR effectué avec le gène de la voie de dégradation des alcanes n'est pas au point, ce qui ne nous a pas permis de suivre de façon qualitative les populations microbiennes du sol et des boues biologiques (résultats non présentés).

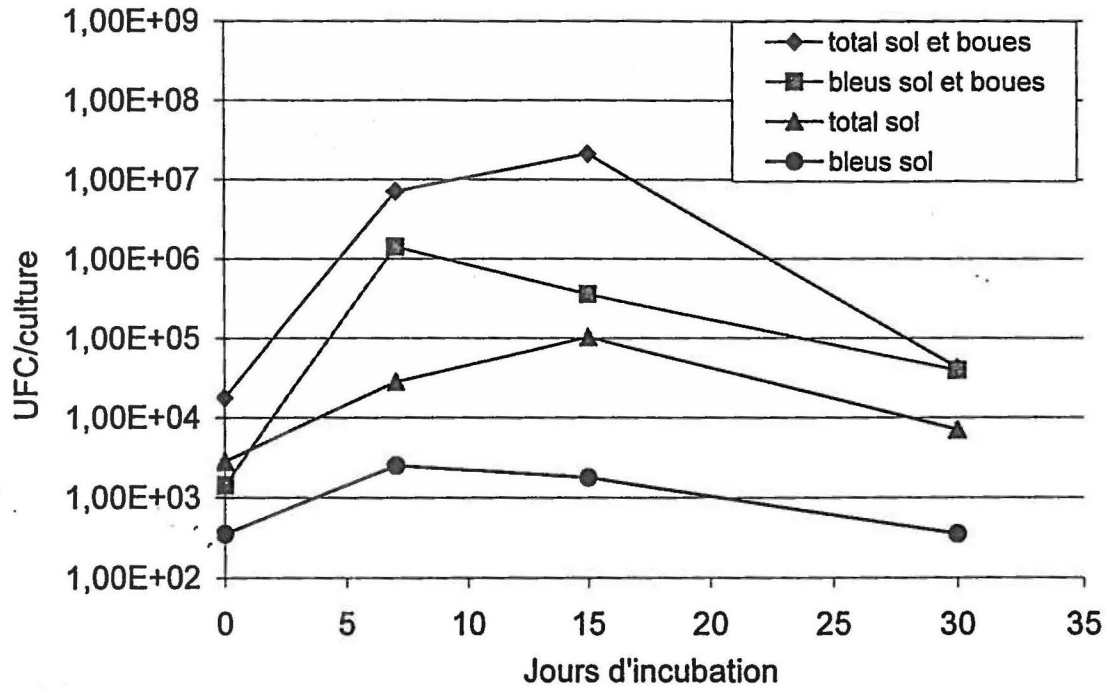
3.2. Suivi de la croissance microbienne en fonction du temps

3.2.1. Sur différents milieux solides

La croissance des microorganismes des microcosmes additionnés de boues, boues filtrées et autoclavées et sans boues a été suivie sur quatre milieux différents soit les milieux TSA, PCA, R2A et BHEL 0,05 % d'extrait de levures.

La concentration bactérienne retrouvée au niveau des microcosmes avec boues a été de $1,8x10^4$ et de $2,8x10^3$ UFC/culture pour les microcosmes sans boues au temps zéro sur le milieu TSA additionné d'indole (Figure 16 A). Le dénombrement des bactéries produisant un pigment bleu a été aussi important en présence de boues. La concentration a été de $1,4x10^3$ UFC/culture dans les microcosmes additionnés de boues et $3,5x10^2$ UFC/culture en leur absence. Après 7 jours d'incubation, la population totale ainsi que les bactéries produisant un pigment bleu, ont montré une croissance rapide dans les microcosmes en présence de boues. La concentration microbienne de ces populations a augmenté de 400 et 1000 fois, respectivement. Par contre, ces même populations n'ont augmenté que de 10 et 7 fois, respectivement, dans les microcosmes sans boues. Les courbes de croissance des microorganismes totaux des microcosmes avec et sans boues ont atteint un maximum après 15 jours d'incubation, soit de $1,7x10^8$ et

A)



B)

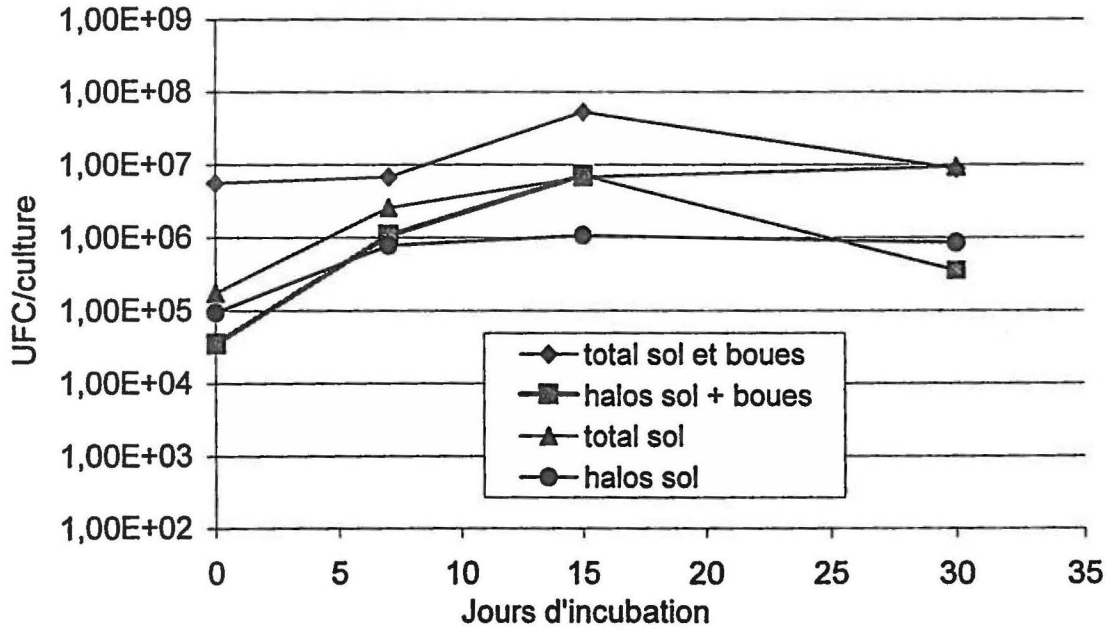


Figure 16: Suivi de la croissance microbienne des microcosmes avec ou sans boues sur milieu TSA additionné d'indole (A) et sur milieu BHEL 0,05% sur lesquels du phénanthrène a été vaporisé (B) en fonction du temps d'incubation.

$8,4x10^6$ UFC/culture, respectivement. Après 30 jours d'incubation, la concentration de ces populations a chuté à $4,3x10^4$ UFC/culture pour les microcosmes en présence de boues et $7,1x10^3$ UFC/culture en absence de boues. Par contre, les microorganismes produisant un pigment bleu dans les microcosmes avec et sans boues, ont atteint un maximum après seulement 7 jours d'incubation. La concentration de ces populations a baissé à $3,9x10^4$ UFC/culture et $3,5x10^2$ UFC/culture, respectivement après un mois d'incubation. En présence de boues, la presque totalité de la population bactérienne présente dans les microcosmes, après 30 jours d'incubation, produit un pigment bleu. Ceci n'est pas le cas en absence de boues puisque la population produisant un pigment bleu ne représente qu'une petite fraction de la population totale présente dans ces microcosmes.

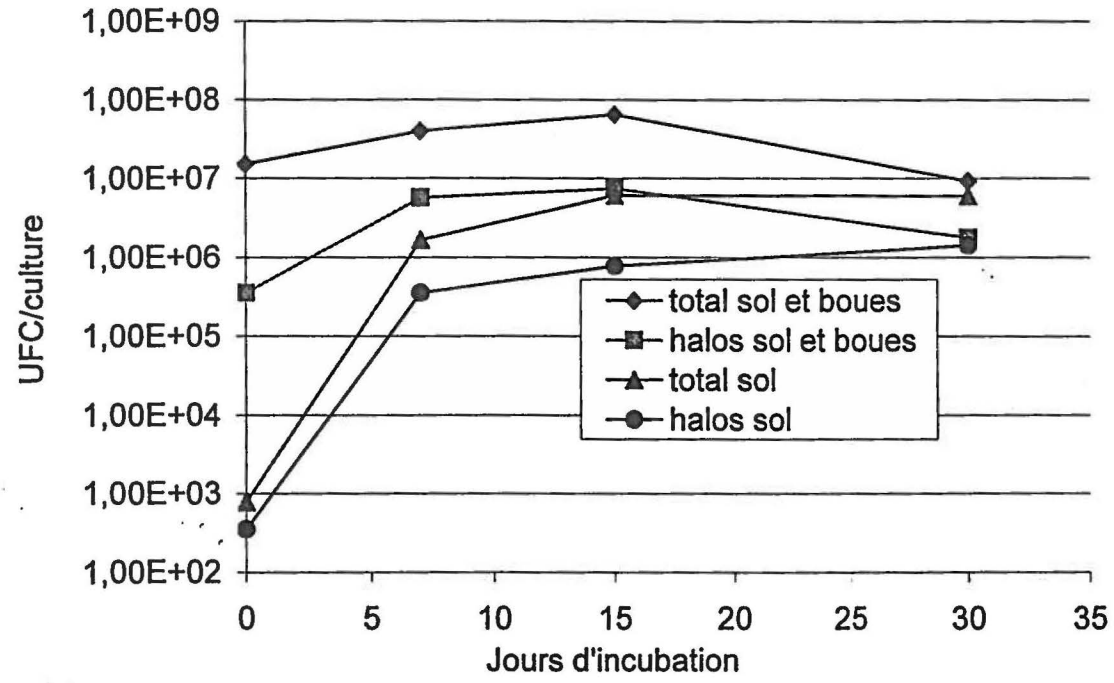
La croissance sur milieu BHEL 0,05 % a été faite en évaluant la formation de halos à partir du phénanthrène (Figure 16 B). La concentration des microorganismes totaux au temps zéro des microcosmes avec boues est plus importante que celle des microcosmes sans boues, soit $5,6x10^6$ et $1,8x10^5$ UFC/culture, respectivement. La croissance de ces microorganismes a été rapide dans les microcosmes en présence ou non de boues de sorte qu'un maximum a été atteint après 15 jours d'incubation. Des résultats semblables ont été obtenus pour les microorganismes produisant des halos. La concentration de bactéries des microcosmes avec boues biologiques a chuté pour atteindre, après 30 jours d'incubation, $8,7x10^6$ UFC/culture pour le compte total et $3,5x10^5$ UFC/culture pour les bactéries formatrices de halos. Par contre, au niveau des microcosmes sans boues la concentration des microorganismes totaux et celle de ceux produisant des halos est restée presque constante jusqu'au 30ème jour d'incubation avec des concentrations respectives de $9,2x10^6$ et $8,5x10^5$ UFC/culture.

La formation de halos a été aussi étudiée sur le milieu PCA. Comme précédemment, les microorganismes totaux au temps zéro des microcosmes avec boues biologiques ont été en nombre plus important qu'en leur absence, soit de $1,5x10^7$ pour

l'un et $7,8x10^2$ UFC/culture pour l'autre (Figure 17 A). Même chose en ce qui concerne les bactéries formatrices de halos soit de $3,5x10^5$ et $3,5x10^2$ UFC/culture, respectivement. La population microbienne totale ainsi que les bactéries pouvant former des halos ont atteint un maximum de $6,5x10^7$ et $7,4x10^6$ UFC/culture, respectivement, dans les microcosmes avec boues après 15 jours d'incubation. Le prolongement de l'incubation à 30 jours a entraîné une diminution de la concentration à $1,8x10^6$ UFC/culture pour les bactéries formatrices de halos. La croissance de ces populations au niveau des microcosmes sans boues a subi une très forte hausse après seulement 7 jours d'incubation pour atteindre $1,7x10^6$ et $3,5x10^5$ UFC/culture, respectivement. Après une période de 30 jours d'incubation, la concentration finale a été de $6,0x10^6$ UFC/culture pour la population totale et $1,4x10^6$ UFC/culture pour les bactéries formatrices de halos.

La population microbienne pouvant former des halos a été évaluée à l'aide du milieu R2A (Figure 17 B). La population totale au temps zéro des microcosmes avec boues biologiques a été plus importante que celle des microcosmes sans boues comme observé avec les autres milieux, soit de $2,8x10^6$ et $1,8x10^5$ UFC/culture, respectivement. Des résultats similaires ont été observés pour les bactéries utilisant le phénanthrène, soit une concentration de $1,0x10^6$ UFC/culture pour les microcosmes avec boues et $3,5x10^4$ UFC/culture en absence de boues. Dans tous les cas, les populations ont atteint un maximum après 15 jours d'incubation, sauf pour celle formant des halos au niveau du microcosme avec boues. Le prolongement de l'incubation des microcosmes avec boues a entraîné une diminution de la concentration à $2,6x10^7$ UFC/culture pour la population totale et $1,4x10^6$ UFC/culture pour les bactéries formatrices de halos. Pour les microcosmes sans boues, la microflore totale était constituée entièrement de microorganismes formant des halos après 15 jours d'incubation. Par la suite, les microorganismes formant des halos à partir du phénanthrène ont chuté plus rapidement que les microorganismes totaux pour atteindre $5,7x10^5$ et $4,4x10^6$ UFC/culture, respectivement.

A)



B)

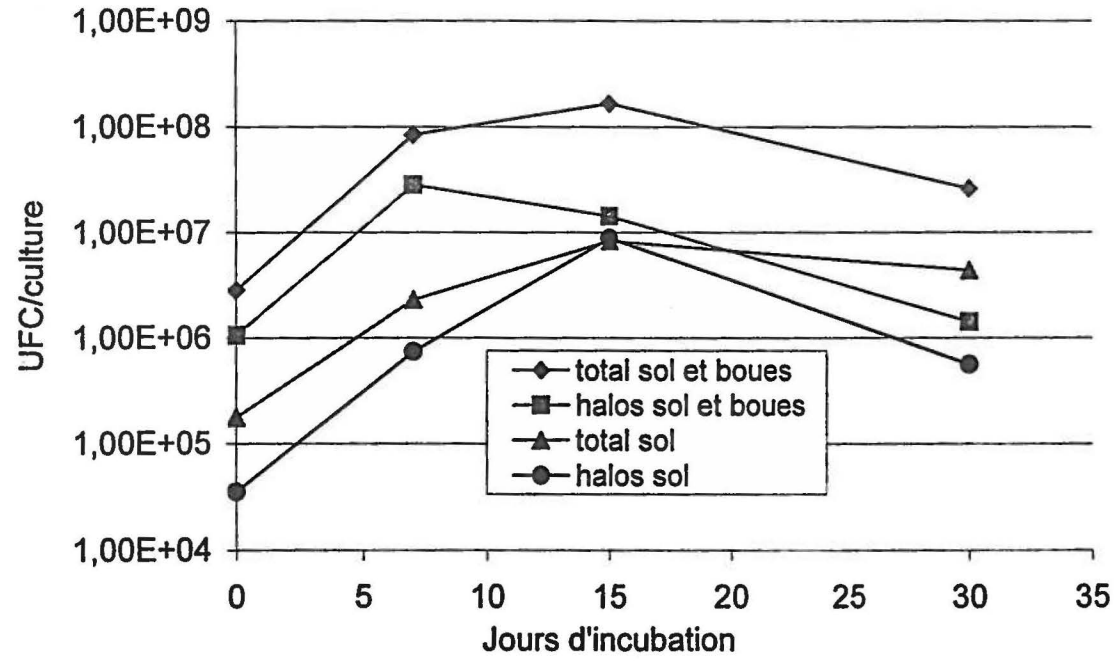


Figure 17: Suivi de la croissance microbienne des microcosmes avec ou sans boues sur milieu PCA (A) et sur milieu R2A (B) sur lesquels du phénanthrène a été vaporisé en fonction du temps d'incubation.

À partir des différents milieux utilisés, une dizaine de colonies ont été sélectionnées en raison de la production d'un pigment brun lorsqu'incubé en présence du phénanthrène. Ces colonies ont été testées pour leur capacité à dégrader divers HAP comme le fluorène, le fluoranthène et le pyrène. Certaines souches pouvaient utiliser un des trois ou même les trois HAP (Tableau 15). Les souches produisant un halo sur milieu solide avec le pyrène ont été testées en milieu liquide avec ce HAP comme source de carbone et d'énergie. Aucune coloration du milieu n'a été observée malgré une croissance apparente. Étant donné que le dosage du pyrène n'a pas été effectué, il est donc impossible d'évaluer de façon certaine la dégradation du pyrène par ces souches.

3.2.2. Milieu liquide

Le suivi des populations dégradant l'hexadécane a révélé que celles-ci sont beaucoup plus importantes au départ au niveau des microcosmes en présence des boues qu'en leur absence (résultats non présentés). Par contre, la croissance de ces populations a été supérieure au niveau des microcosmes sans boues puisque la concentration microbienne est passée de $1,8x10^5$ à $1,8x10^8$ bactéries/culture et de $1,8x10^8$ à $1,8x10^9$ bactéries/culture en présence de boues après 30 jours d'incubation (résultats non présentés).

3.2.3. PCR

Un suivi des populations microbiennes possédant les gènes de dégradation des HAP a aussi été effectué par la méthode du PCR. Un signal a été observé au niveau des microcosmes avec ou sans les boues biologiques tout au long des 30 jours d'incubation (résultats non présentés). Ceci révèle la présence des bactéries dégradant les HAP tout au long des 30 jours d'incubation.

Tableau 15: Formation de halos par diverses souches isolées à partir des microcosmes avec ou sans boues.

Souches	HAP testés		
	Fluorène	Fluoranthène	Pyrène
VAL 1	+	+	+
VAL 2	+	-	+
VAL 3	+	-	+
VAL 4	+	-	+
VAL 5	+	+	+
VAL 6	+	+	+
VAL 7	+	+	+
VAL 8	n.v.	+	+
VAL 9	+	+	+
VAL 10	+	-	-
VAL 11	+	-	-

+ : présente de halos
- : absence de halos
n.v. : non vaporisé

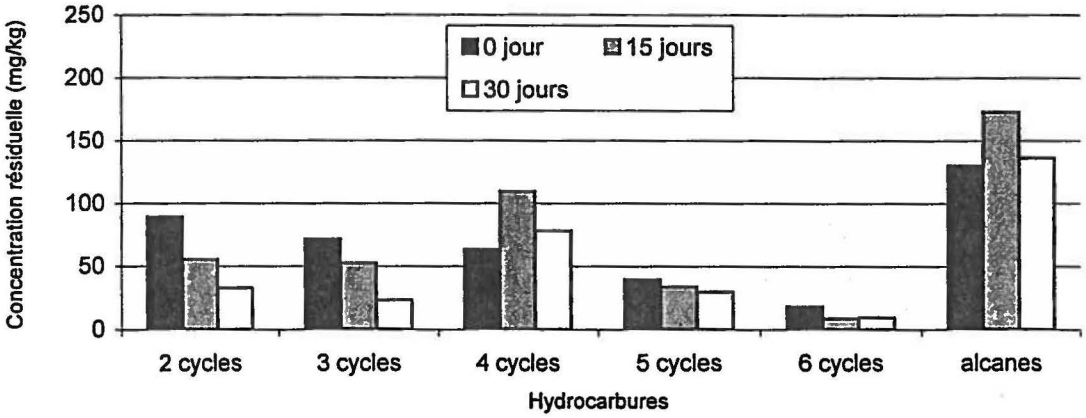
4. AUTRES SOLS

4.1 Microcosmes avec un sable plus contaminé

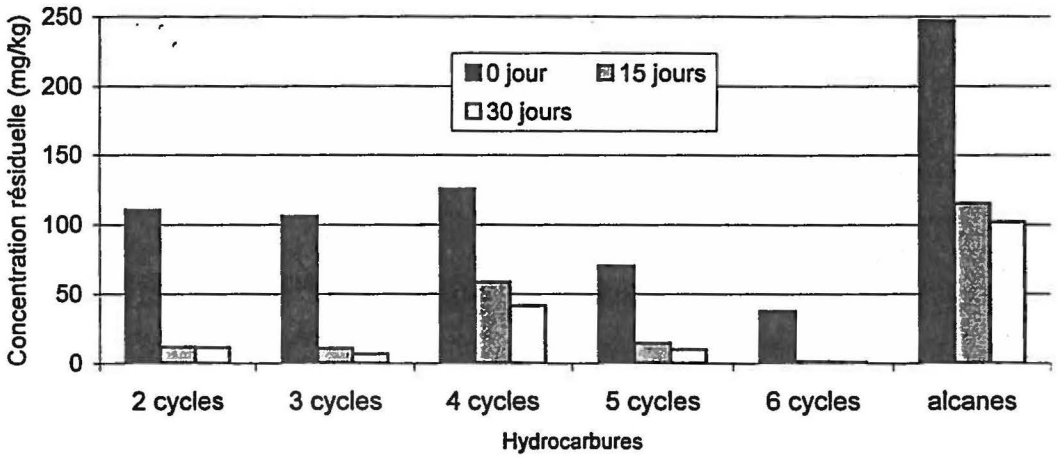
Pour rester dans la même optique, un sol de type sablonneux plus contaminé provenant de la sablière Thouin a été utilisé en microcosmes. La concentration totale de l'ensemble des HAP au départ dans ce sol a été de 450 ppm comparativement à 280 ppm pour le lot de sol précédent (Figure 18). Les valeurs retrouvées au niveau des microcosmes avec le sol peu contaminé étaient de 90 et 72 ppm pour les HAP à deux et trois cycles, comparativement à 111 et 106 ppm pour le sol plus contaminé. Pour les autres HAP, leur concentration a doublé dans le nouveau lot de sol de la sablière. Par exemple, la concentration des HAP de quatre cycles est passée de 63 à 126 ppm. Pour leur part, les alcanes au niveau du sol utilisé précédemment étaient de 130 ppm par rapport à 247 ppm pour le nouveau lot de sol.

Quelque soit le lot de sol utilisé, l'enlèvement des hydrocarbures a été important en présence de boues biologiques (Figure 18). Après 30 jours d'incubation, la concentration résiduelle dans les deux sols se situait en dessous de 10 ppm pour les HAP de deux, trois et six cycles. Ce qui correspond à 93, 91 et 58 % de dégradation pour le sol peu contaminé et 93, 92 et 76 % pour le lot de sol plus contaminé. Pour les HAP de quatre et cinq cycles, les concentrations ont été en dessous de 45 ppm, soit à 64 et 55 % d'enlèvement, respectivement, pour le sol plus contaminé et en dessous de 40 ppm, correspondant à 38 et 40 % d'enlèvement, respectivement, pour le sol peu contaminé. Par contre, la dégradation des alcanes a été plus efficace dans le lot de sol peu contaminé. La concentration résiduelle dans le microcosme avec le sol plus contaminé a été trois fois plus élevée que celle retrouvée dans le sol moins contaminé après 30 jours. Cependant, la baisse de la concentration au niveau de ces microcosmes a été de 106 et 148 ppm pour le sol peu et plus contaminé, respectivement. La comparaison du pourcentage de dégradation des alcanes a permis de constater que celui-ci a été plus important pour les microcosmes avec le sol peu contaminé (82 %) par rapport au lot de sol plus contaminé (60 %).

A)



B)



C)

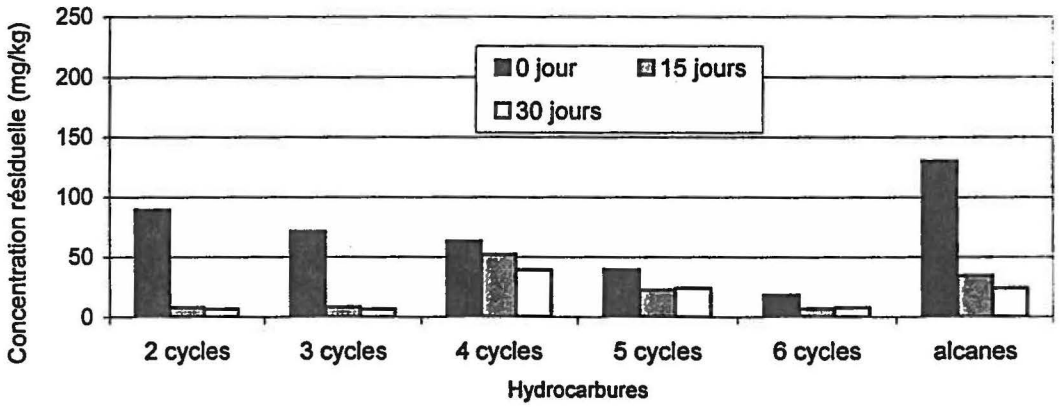


Figure 18: Dégradation des HAP et des alcanes en fonction du temps d'incubation dans les microcosmes sans (A) ou avec boues (B) contenant un sol plus contaminé et dans des microcosmes avec boues (C) contenant un sol peu contaminé.

L'analyse de la dégradation des hydrocarbures dans les microcosmes avec et sans boues avec le lot de sol plus contaminé, a permis d'évaluer l'efficacité des boues biologiques dans ces conditions (Figure 18). En effet, la dégradation des HAP à deux, trois et quatre cycles et des alcanes a été accéléré en présence des boues dans le sol plus contaminé. Contrairement aux microcosmes avec le sol peu contaminé, il y a eu une certaine dégradation des HAP à quatre cycles et des alcanes en absence de boues dans les microcosmes avec le lot de sol plus contaminé.

4.2 Microcosmes avec un sol contaminé au créosote

Des expériences avec un sol contaminé au créosote ont été effectuées afin d'évaluer si les boues biologiques pouvaient avoir le même effet qu'avec le sable. Comme aucune dégradation n'a été observée après 21 jours d'incubation, seulement cinq composés représentatifs de la contamination du sol par les hydrocarbures ont été suivis durant le reste de la période d'incubation des microcosmes. Ce sol est fortement contaminé en hydrocarbures comme en témoigne la concentration (ppm) des cinq composés : acénaphtalène (2044), phénanthrène (3075), fluoranthène (2843), pyrène (1762) et hexacosane (2725).

Après 30 jours d'incubation, aucune dégradation n'a été observée au niveau des microcosmes effectués avec le sol contaminé au créosote. Par contre, après 60 jours d'incubation une faible dégradation est apparue en ce qui concerne le phénanthrène. La concentration de ce HAP a été réduite à 2263 ppm, soit 20 % de dégradation tandis qu'à avec le sol de la sablière la dégradation était déjà de 100 %. Finalement, après 75 jours d'incubation, la concentration résiduelle de phénanthrène a été de 1322 ppm, soit 54 % de dégradation. Pour l'acénaphthalène, le fluoranthène, l'hexacosane et le pyrène, leur concentration n'a pas bougé. Une évaluation de la viabilité des microorganismes présents dans le sol a été effectuée pour les jours 0 et 7, afin de déterminer si la forte contamination du sol affectait les flores microbiennes. La viabilité de la microflore s'est

maintenue, indiquant qu'il n'y a pas de croissance ni de mortalité de la population microbienne présente dans ces cultures en microcosmes.

DISCUSSION

1. AVANTAGES DE L'ADDITION DES BOUES BIOLOGIQUES À UN SOL CONTAMINÉ AUX HYDROCARBURES

L'amélioration de la dégradation des hydrocarbures contaminant des sols en y ajoutant des boues biologiques, un déchet industriel provenant d'une usine de traitement des eaux usées d'une raffinerie de pétrole, est une méthode peu documentée dans la littérature. Dans la présente étude, l'addition de ces boues au sol de la sablière Thouin a permis la dégradation des HAP de 4 cycles comme le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a) anthracène et le chrysène qui sans ajout ne sont pas dégradés. L'addition de ces boues a aussi permis l'accélération de la biodégradation de certains HAP de 2 cycles comme le naphthalène, le 1-méthylnaphthalène et l'acénaphthylène, ainsi que ceux de trois cycles comme l'acénaphthène, le fluorène et l'anthracène. Après 30 jours d'incubation, nous avons obtenu 76 et 94 % d'enlèvement pour les HAP de 2 et 3 cycles et 83 % pour les HAP de 4 cycles. Nos résultats sont semblables à ceux obtenus par Bisaillon *et al.* (1998) qui ont utilisé le même type de biotraitement. Ceci suggère donc que les boues possèdent un potentiel de réutilisation intéressant au niveau environnemental.

En même temps que la dégradation des HAP, celle des alcanes a aussi été suivie dans les cultures. La disparition, entre autre, de l'octadécane, du nonadécane, de l'éicosane et du docosane n'a été observée qu'en présence des boues. Dans les cultures avec boues, la dégradation des alcanes a été de 75 % par rapport à aucune dégradation en leur absence après 30 jours d'incubation. La présence d'un grand nombre de contaminants et la compétition métabolique qui peut en découler pourraient expliquer le fait que certains hydrocarbures aliphatiques soient tout aussi difficilement dégradés que certains HAP dans ces cultures. Ceci signifie donc que les boues n'agissent pas seulement sur la biodégradation des HAP mais aussi sur celle des alcanes et confirme l'effet bénéfique de l'addition de ces microorganismes, parfois considéré comme un déchet industriel, à un sol contaminé aux hydrocarbures.

En plus d'accélérer la dégradation des hydrocarbures, les boues biologiques ont permis de réduire la concentration de certains HAP (benzo(a)anthracène, chrysène et benzo(a)pyrène) à des valeurs inférieures au critère C des normes du MEF. De plus, dans ces cultures, la concentration résiduelle du benzo(ghi)périylène, de l'indo(1,2,3-cd)pyrène, de l'acénaphthylène, de l'anthracène et du naphthalène ont atteint le critère A. En absence des boues, seuls le naphthalène et l'acénapthalène ont vu leur concentration descendre en dessous de la plage B-C. Ce traitement par ajout de boues biologiques est par conséquent plus performant ce qui permet de réhabiliter rapidement un sol contaminé. La présence de boues semble donc avantageuse pour la décontamination d'un sol pollué comme celui de la sablière Thouin.

2. PRINCIPAUX FACTEURS DE L'AMÉLIORATION DE LA DÉGRADATION DES HYDROCARBURES

Les boues biologiques provenant du traitement des eaux usées d'une raffinerie de pétrole contiennent non seulement de nombreuses populations bactériennes adaptées à la dégradation des hydrocarbures, mais sont aussi très riches en azote. Ces deux facteurs pourraient être impliqués dans l'amélioration de la dégradation des hydrocarbures au niveau du sol de la sablière Thouin. Les différents essais menés pendant nos travaux ont permis de distinguer l'effet de ces deux facteurs.

2.1 Analyse des performances de la dégradation

Le sol de la sablière Thouin, tel que démontré par Lirette (1996), est déficient en azote. Le rapport C : N de ce sol est de 100 : 2, ce qui est différent de celui rapporté comme étant optimal dans la littérature (120 : 10) pour la dégradation des hydrocarbures (Wilson et Jones, 1993). Comme ce rapport est de 100 : 2070 pour les boues biologiques, il a été possible d'obtenir un rapport de 100 : 13 en y ajoutant 0,7% (p/p) au sol. Nos résultats ont démontré que l'ajustement du rapport C : N du sol accélérait et améliorait la dégradation des hydrocarbures.

De l'azote organique (urée) ou inorganique (nitrate d'ammonium) a été ajouté en substitution des boues afin de vérifier si l'amélioration de la dégradation des hydrocarbures était seulement due à la grande quantité d'azote contenu dans les boues. Ce nutriment pourrait être un des éléments limitant pour les microorganismes du sol et ainsi permettre l'augmentation de la dégradation des hydrocarbures. L'azote ajouté à nos cultures a entraîné une faible diminution de la dégradation des HAP par rapport à l'ajout des boues.

La différence entre les concentrations résiduelles en présence de boues ou d'azote dans les cultures pourrait suggérer l'implication d'un ou plusieurs autres facteurs dans la dégradation des HAP. L'absence des bactéries des boues biologiques dans les cultures avec azote peut expliquer que celles-ci soient un peu moins performantes que celles avec boues. La microflore des boues ne jouerait qu'un rôle mineur au niveau de la dégradation. Il semblerait donc que l'azote soit l'élément majeur des boues qui permet d'accélérer la dégradation des HAP dans le sol de la sablière Thouin. Par conséquent l'addition de boues biologiques semble améliorer l'activité microbienne du sol surtout en rétablissant le ratio C : N du sol de la sablière.

Comme cela fut le cas pour les HAP, la dégradation des alcanes a été suivie suite à la substitution des boues par des sources d'azote organique ou inorganique. Nous n'avons pas observé de stimulation suite à l'ajout d'azote à nos cultures. En fait, la substitution des boues biologiques par de l'urée ou du nitrate d'ammonium a considérablement diminué la dégradation de ces composés par rapport à l'addition de boues. Ceci semble indiquer que les microorganismes des boues biologiques possèdent un meilleur potentiel pour dégrader les alcanes que la flore indigène de la sablière Thouin. Les bactéries provenant des boues semblent plus adaptées à la dégradation des alcanes que des HAP. Ceci serait probablement dû au fait que ces boues proviennent du traitement d'eaux usées contenant de grandes concentrations d'alcanes et que les microorganismes des boues sont adaptés à dégrader ce type de contaminant. Ceci peut

être confirmé par le compte microbien qui révèle une plus forte concentration de bactéries dégradant les alcanes au niveau des boues plutôt que dans le sol. Il semble donc que l'azote des boues biologiques ne soit pas un facteur important dans l'accélération de la dégradation des alcanes comme il semble l'être pour celle des HAP.

De façon similaire, la substitution des boues par de l'azote a diminué la dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}. Leur dégradation a été environ 3 fois plus faible pour les cultures avec de l'azote que celles contenant des boues. Ceci suggère une fois de plus que les microorganismes des boues sont importants pour la dégradation des hydrocarbures. Mais comme les hydrocarbures C_{10} à C_{50} comprennent les HAP, les alcanes et autre composés, ce paramètre ne permet pas d'établir sur quel type d'hydrocarbures les bactéries des boues sont particulièrement actives.

2.2 Microorganismes

Pour analyser l'importance des microorganismes indigènes des boues biologiques, des boues stérilisées par filtration ou par autoclavage ont été additionnées aux cultures au lieu de boues non stérilisées. La dégradation des HAP n'a pas été affectée par l'ajout de ces boues stérilisées au lieu des boues non stérilisées. De plus, des cultures dont le sol a été irradié et où des boues non stérilisées ont été ajoutées ont montré une dégradation des HAP plus faible que dans les cultures avec un sol non irradié et avec boues. Ces résultats confirment que les principaux microorganismes impliqués dans la dégradation des HAP proviennent surtout du sol de la sablière et non des boues. Comme il a été possible d'observer pour les HAP, Margesin et Schinner (1997) ont montré que la biostimulation de la microflore indigène du sol par un fertilisant inorganique était plus efficace que la bioaugmentation avec un inoculum de microorganismes pré-adaptés. Donc les boues ont surtout joué un rôle de suppléments nutritifs pour la microflore du sol de la sablière plutôt que d'enrichir la population bactérienne capable de dégrader les HAP. C'est donc dire que l'apport en azote fourni par les boues permet d'améliorer la dégradation des HAP par la microflore indigène du sol principalement. Les résultats obtenus suggèrent qu'un des

facteurs qui limite la performance de la microflore indigène du sol de la sablière dégradant les HAP est la faible concentration d'azote de ce sol.

Contrairement aux HAP, l'addition de boues biologiques stérilisées a entraîné une réduction significative de la dégradation des alcanes. Ceci indique donc que les microorganismes indigènes des boues sont particulièrement impliqués dans la dégradation des alcanes. Les résultats obtenus avec les microcosmes additionnés d'azote, confirment cette hypothèse, puisque aucune amélioration de la dégradation des alcanes n'a été observée en absence de boues biologiques. De plus, l'irradiation du sol n'a que faiblement affecté la dégradation des alcanes lorsque des boues biologiques sont ajoutées à ce sol. Ceci est d'autant plus vrai puisque le sol contient peu de microorganismes pouvant effectuer la dégradation des contaminants visés par rapport aux boues. L'adaptation de la microflore des boues à la dégradation des alcanes vient probablement du fait que les boues en contiennent une forte concentration par rapport au sol.

Contrairement aux alcanes, la dégradation des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50} est semblable en présence de boues stérilisées ou non, mais, dans les deux cas, est meilleure et plus rapide qu'en ajoutant de l'azote. Ceci semble indiquer que les boues possèdent des éléments nutritifs dont le sol de la sablière manque pour dégrader les hydrocarbures. De plus, l'absence de la microflore des boues semble diminuer la compétition avec les microorganismes déjà présents au niveau du sol. Ceci est d'autant plus vrai que le sol contient une forte concentration de microorganismes dégradant les HAP et que ceux-ci sont compris dans les hydrocarbures C_{10} à C_{50}.

Par conséquent, les microorganismes des boues joueraient un rôle majeur tandis que l'azote un rôle mineur dans la dégradation des alcanes et des hydrocarbures C_{10} à C_{50}. Cette augmentation des populations microbiennes constitue une bioaugmentation. Par contre, au niveau des HAP, la microflore indigène du sol est un des facteurs majeurs de la

dégradation de ces composés. Par conséquent l'addition des boues biologiques constitue une biostimulation, c'est-à-dire que c'est principalement l'azote qui stimulerait la dégradation des HAP, les microorganismes des boues ne joueraient donc qu'un rôle mineur.

2.3 Minéralisation

L'utilisation du phénanthrène et de l'hexadécane marqués au ^{14}C nous a permis de mettre en évidence la capacité des microorganismes indigènes du sol et des boues à minéraliser à 37 % le phénanthrène, c'est-à-dire d'effectuer une dégradation du polluant en éléments inorganiques. La présence de boues biologiques dans les cultures de sol contaminé a permis la minéralisation complète du phénanthrène. Les cultures non additionnées de boues n'ont pas montré de minéralisation significative de ce polluant. L'enlèvement du phénanthrène non marqué a été de 92 % dans les cultures en présence de boues et 24 % en leur absence. La différence entre le pourcentage de dégradation et de minéralisation (68 %) suggère que ce HAP a été transformé en intermédiaires de dégradation qui s'accumulent ou sont incorporés au niveau de la biomasse ou encore adsorbé aux particules du sol. En absence de boues, la microflore du sol a été incapable de minéraliser le phénanthrène, probablement parce que le sol est déficient en azote et ne permet pas un développement adéquat de cette dernière. D'ailleurs, Lirette (1996) a obtenu une minéralisation du phénanthrène de 90 % suite à la biostimulation de la flore indigène du sol de la sablière avec de l'extrait de levures. Par conséquent, il semble probable qu'un ajout sera nécessaire pour améliorer ou obtenir la minéralisation de certains HAP. Ceci suggère que la microflore bactérienne du sol possède une carence nutritive, qui serait en partie comblée par l'addition de boues.

La substitution de boues biologiques par de l'azote n'a pas permis la minéralisation du phénanthrène, puisque les pourcentages de CO_2 marqué obtenus n'ont jamais dépassé les valeurs observées dans les contrôles abiotiques. En fait, l'ajout d'azote à nos cultures a aussi diminué la dégradation du phénanthrène par rapport à celles

contenant des boues de façon similaire aux cultures en microcosmes. Ceci semble indiquer que même si le sol possède la concentration la plus élevée de microorganismes ayant le potentiel de dégradation des HAP, les boues sont nécessaires pour la décontamination du sol de la sablière. C'est donc dire qu'il y aurait un autre facteur dans les boues que l'azote qui serait responsable de la minéralisation. Il se pourrait aussi que la microflore indigène du sol soit capable de transformer le phénanthrène sans toutefois le dégrader complètement ou bien qu'elle soit inhibée par les intermédiaires de dégradation et que c'est la microflore des boues qui effectuerait leur minéralisation.

Cette hypothèse est d'autant plus plausible que l'élimination des microorganismes des boues biologiques a donné les mêmes résultats que ceux observés avec les cultures contenant de l'azote, c'est-à-dire que l'addition de boues stérilisées n'a pas permis la minéralisation du phénanthrène. Comme pour les cultures avec azote, la dégradation du phénanthrène non marqué a été plus importante que la minéralisation. Les boues semblent donc jouer un rôle important au niveau de la minéralisation des HAP. L'effet combiné des microorganismes du sol et des boues semble nécessaire à la minéralisation des HAP. Ceux du sol de la sablière joueraient un rôle principalement au niveau des premières étapes de dégradation alors que ceux des boues termineraient le travail.

Comme dans le cas des HAP, la minéralisation de l'hexadécane n'a été obtenue que dans les cultures additionnées de boues, soit environ 12 % après 45 jours d'incubation. Pour leur part, Kästner *et al.* (1995), après avoir ajouté du compost dans un bioréacteur contenant du sable contaminé aux HAP et aux alcanes, ont obtenu une minéralisation d'environ la moitié de l'hexadécane ajouté après un temps d'incubation similaire. Même chose pour Effroymson et Alexander (1991) qui ont obtenu une minéralisation de 30% en culture liquide, après avoir ajouté de l'heptamethylnonane dans lequel était dissout l'hexadécane. La plus faible performance de minéralisation observée ici par rapport à ces deux études pourrait être attribuée aux différentes conditions de cultures utilisées. Par exemple, contrairement aux autres, les cultures que nous avons

utilisées n'étaient pas agitées et comme nous avons pu le constater l'aération a augmenté la minéralisation du phénanthrène. Par contre, la dégradation a été de 81 %, ce qui suggère qu'une grande partie de l'hexadécane est probablement transformée en intermédiaires qui s'accumulent ou sont incorporés dans la biomasse.

2.4 Analyse de la microflore

Afin de vérifier s'il y avait un lien entre la croissance des microorganismes des différentes cultures et leurs niveaux de dégradation, différents suivis de populations bactériennes ont été effectués. De façon générale, les divers patrons de croissance observés ont débuté par une augmentation de la population pour atteindre un maximum après environ 15 jours d'incubation suivie par une tendance à la baisse après 30 jours. Dans les cultures additionnées de boues, la corrélation entre la vitesse de croissance et la dégradation est remarquable, puisqu'en général, plus de 50 % des polluants sont dégradés après 15 jours d'incubation. Les populations bactériennes ont toutes considérablement diminué après 30 jours, ce qui semble correspondre avec les faibles concentrations de polluants résiduels au niveau du sol. Ceci est probablement dû au fait que la microflore dégradant les HAP dépend de la concentration de ces contaminants ainsi que d'une présence suffisante de nutriments pour soutenir leur croissance. Ceci semble être confirmé par le compte microbien des populations dégradant les HAP qui révèle que le sol possède une concentration plus élevée que les boues. L'analyse de la contamination des HAP permet d'appuyer cette hypothèse car le sol possède une concentration de HAP plus forte que les boues, donc une microflore plus adaptée à leur dégradation.

Par contre, cette même corrélation n'est pas observable au niveau du suivi des populations microbiennes dégradant les alcanes, car elles ne cessent pas de croître tout au long de la dégradation de ces contaminants. Les cultures avec boues possèdent une plus forte population de bactéries pouvant dégrader l'hexadécane que celles du sol. Malgré le fait qu'il semble avoir une absence de dégradation dans les cultures sans boues, une croissance microbienne, avec comme seule source de carbone l'hexadécane, semble être

croissance microbienne, avec comme seule source de carbone l'hexadécane, semble être observable. La microflore du sol semble donc capable de croître en utilisant ce composé, mais ce contaminant ne semble pas assez biodisponible aux bactéries pour permettre une biodégradation ou les intermédiaires produits causent l'inhibition de leur croissance. Ceci semble indiquer que le sol et les boues possèdent une microflore pouvant dégrader les alcanes mais que celle des boues est plus adaptée pour effectuer ce travail.

2.5 Comparaison avec la littérature scientifique

Frigon *et al.* (1997), Kästner *et al.* (1995) et van Ginkel *et al.* (1997) ont aussi ajouté des boues à des réacteurs contenant soit un sol contaminé, soit un contaminant comme seule source de carbone. Ces auteurs ont tous obtenu 90 % et plus d'enlèvement de benzènes chlorés ou d'anthracène et d'hexadécane ou l'EDTA, en moins de 10 jours. Les meilleures performances observées dans ces études par rapport à la biodégradation des HAP et des alcanes dans nos cultures enrichies de boues biologiques pourraient être dues en partie à la vitesse de dégradation de ces composés. Car plus un contaminant est complexe, plus sa vitesse d'enlèvement est réduite. De plus, les cultures qu'ils ont utilisées n'étaient contaminées qu'avec un seul polluant tandis que les nôtres en contenaient plus d'une cinquantaine. En effet, plusieurs études ont démontré que la présence de certains HAP peut ralentir ou inhiber la dégradation des autres HAP (Bouchez *et al.*, 1995; Stringfellow et Aitken, 1995; Tiehm et Fritzsche, 1995). La présence d'un nombre important de contaminants dans un sol semble ralentir leur dégradation mais l'ajout de boues améliore significativement la dégradation des HAP et des alcanes. C'est le cas des HAP de quatre cycles qui sont reconnus pour être récalcitrants aux traitements biologiques.

Plus particulièrement, comme l'ont observé plusieurs auteurs (Rosenberg et Ron, 1996; Prince, 1993; Pritchard *et al.*, 1992; Glaser, 1991) la faible concentration d'azote disponible au niveau d'un sol pourrait être un des principaux facteurs limitant la dégradation des hydrocarbures. Plusieurs travaux ont démontré que l'ajout d'azote

1995; Ellis *et al.*, 1990). Nos travaux révèlent des résultats similaires suite à l'apport d'azote pour la dégradation des HAP. Par contre, contrairement à Fedorak et Westlake (1981) et à Toccalino *et al.* (1993) qui ont observé une amélioration de la dégradation des alcanes après avoir ajouté de l'azote, nous n'avons pas constaté de dégradation de ces composés.

Non seulement les boues fourniraient de l'azote mais aussi des bactéries adaptées à la dégradation des alcanes permettant l'amélioration de leur dégradation. Il y aurait donc un enrichissement, c'est-à-dire une augmentation des populations microbiennes déjà présentes dans le sol. Comme l'ont observé de nombreux auteurs (Moller et Ingvorsen, 1993; Wiesel *et al.*, 1993) l'addition de bactéries ou de consortium isolés de sols contaminés permet d'augmenter l'efficacité des biotraitements de sols pollués aux hydrocarbures. Pesce et Wunderlin (1997) aussi ont démontré que l'addition de microorganismes adaptés à la dégradation du 2,6-diaminotoluène permettait une accélération de la biodégradation de ce composé. Ceci suggère donc que les boues agissent au niveau de la dégradation des HAP grâce à l'azote qu'elles contiennent et au niveau de celle des alcanes avec l'aide de sa microflore indigène.

3. AUTRES SOLS

Ces expériences testaient l'efficacité du biotraitement sur un sable plus contaminé et un sol contaminé au créosote. Des recherches effectuées par Huesemann et Moore (1993) concernant l'influence de la concentration de pétrole sur sa dégradation dans un sol sablonneux ont démontré que le pétrole en plus faible concentration était plus rapidement dégradé que celui avec une concentration plus forte. Contrairement à ces auteurs, le fait d'avoir utilisé un sable plus contaminé n'a pas affecté la dégradation des HAP par rapport au sol moins contaminé. Par contre, la dégradation des alcanes dans ces cultures a été moins importante après 30 jours d'incubation que dans le sol peu contaminé. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la quantité de boues biologiques, possédant la microflore dégradant les alcanes n'était pas suffisante dans ces conditions.

possédant la microflore dégradant les alcanes n'était pas suffisante sous ces conditions. Comme démontré par Ramadan *et al.* (1990), la taille de l'inoculum pourrait être trop petite pour dégrader la plus forte concentration d'alcanes. Une autre possibilité pourrait être la toxicité des intermédiaires de dégradation des alcanes. Contrairement aux résultats obtenus avec le sol peu contaminé, une certaine dégradation des alcanes a été observée en absence de boues avec le sable plus contaminé. Ceci semble suggérer que le sol possède bien une population microbienne pouvant dégrader les alcanes mais la disponibilité de ces contaminants pour la flore indigène du sol pourrait être la cause de leur faible dégradation. Ces résultats semblent démontrer que l'ajout de boues à un sable plus contaminé possède la capacité d'améliorer la dégradation des hydrocarbures.

Les résultats obtenus avec le sol contaminé au créosote sont difficiles à interpréter. Le fait de ne pas connaître les antécédents de ce sol ainsi que sa caractérisation chimique, rend l'interprétation difficile. Comme l'a fait remarquer Salanitro *et al.* (1997) la dégradation de très fortes concentrations se fait beaucoup plus lentement que pour de faibles concentrations. Nous avons obtenu des résultats similaires car après 45 jours d'incubation aucune diminution n'a été constatée. Ceci semble indiquer que la biodisponibilité est un paramètre majeur lorsqu'il s'agit d'un sol riche en matière organique. De plus, la littérature indique que les HAP de hauts poids moléculaires sont toxiques et mutagènes (Singleton, 1994; Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981). Mais les très fortes concentrations de ces composés ne semblent pas affecter la viabilité des microorganismes puisque après 7 jours une concentration similaire à celle du départ était toujours présente. Même si la dégradation avait bien débuté après 75 jours d'incubation, l'ajout de boues à ce type de sol n'a pas eu d'effet stimulateur comme observé avec le sol de la sablière.

CONCLUSION

L'addition au sol de boues biologiques, à ce jour considéré comme un déchet industriel d'une raffinerie de pétrole, au sol améliore la dégradation des hydrocarbures par rapport à l'addition d'eau. L'analyse de ce biotraitement avait pour but de déterminer quels étaient les facteurs des boues biologiques qui étaient impliqués dans l'accélération de la dégradation des hydrocarbures. L'étude de certaines composantes de ces boues biologiques a permis de conclure que :

1) Les boues biologiques permettent l'accélération de la dégradation des HAP de deux à trois cycles. Plus particulièrement, dans le cas des alcanes et des HAP à quatre cycles, leur dégradation n'est possible qu'en présence des boues biologiques.
2) Un avantage de ce biotraitement est que les normes gouvernementales sont non seulement plus rapidement atteintes, mais les concentrations résiduelles sont beaucoup plus faibles que celles retrouvées dans le sol additionné d'eau.
3) L'addition d'urée et de nitrate d'ammonium au lieu des boues a permis de constater que l'azote contenu dans celles-ci jouait un rôle majeur dans la dégradation des HAP. Par contre, l'ajout de boues stérilisées par filtration ou autoclavage a permis de démontrer que les microorganismes qu'elles contenaient jouaient un rôle majeur dans la dégradation des alcanes comparativement aux HAP.
4) L'élimination de la microflore indigène du sol par irradiation a démontré leur importance pour la dégradation des hydrocarbures.
5) L'effet accélérateur de la dégradation des hydrocarbures, suite à l'addition des boues biologiques, a même été mis en évidence à l'aide d'un sol plus fortement contaminé.
6) La minéralisation du ^{14}C-phénanthrène et ^{14}C-hexadécane s'est révélée l'un des principaux avantages de l'utilisation des boues biologiques pour la décontamination d'un sol pollué car ce n'est qu'en présence des boues biologiques qu'il y a eu formation de dioxyde de carbone radioactif lors de la dégradation des HAP et des alcanes.

7) L'accélération de la dégradation causée par l'addition des boues biologiques au sol contaminé a aussi été observée au niveau des hydrocarbures pétroliers C_{10} à C_{50}.
8) L'évaluation des populations microbiennes a permis de démontrer que le sol était riche en microorganismes dégradant les HAP tandis que les boues biologiques l'étaient en microorganismes dégradant les alcanes.
9) Le suivi de la croissance a démontré que le maximum de croissance a été atteint après 15 jours d'incubation. La présence d'une microflore dégradant les HAP dans le sol et son absence au niveau des boues biologiques a été confirmé par l'utilisation de la technique du PCR.
10) Finalement, l'utilisation d'un sol contaminé au créosote a permis de constater que l'accélération de la dégradation des hydrocarbures suite à l'addition de boues est moins performante comparativement à celle observée avec le sol de la sablière Thouin.

BIBLIOGRAPHIE

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

Anonyme. 1989. The sludge dilemma. Oper. Forum. **4** : 15-16.

Anonyme. 1997. Communication personnelle. Gouvernement du Québec, Minstère de l'Environnement et de la Faune.

Alcock, R.E., Johnston, A.E., mcGrath, S.P., Berrow, M.L., Jones, K.C. 1993. Long-term changes in the polychlorinated biphenyl (PCB) content of United Kingdom soils. Environ. Sci. Technol. **27** : 1918-1923.

Aprill, W., Sims, R.C., Sims, J.L., Matthews, J.E. 1990. Assessing detoxification and degradation of wood preserving and petroleum wastes in contaminated soil. Waste Management & Research. **8** : 45-65.

AQTE. 1992. Dans : Pour une bonne gestion des boues. Association québecoise des techniques de l'eau. 35 pages.

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

Atlas, R.M. 1977. Stimulated petroleum degradation. Crit. Rev. Microbiol. **5** : 371-386.

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

Atlas, R.M. (ed.) 1984. Petroleum Microbiology. Macmillan Co., New York.

Atlas, R.M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of soil spils. J. Chem. Technol. Biotechnol. **52** : 149-156.

Atlas, R.M., Bartha, R. 1973. Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan Bay. Environ. Pollut. **4** : 291-300.

Atlas, R.M., Schofield, A., Morelli, F.A., Cameron, R.E. 1976. Interactions of microorganisms and petroleum in the arctic. Environ. Pollut. **10** : 35-44.

Atlas, R.M., Horowitz, A., Busdosh, M. 1978. Prudhoe crude oil in arctic marine ice, water, and sediment ecosystems : degradation and interactions with microbial and benthic communities. J. Fish. Res. Board Can. **35** : 585-590.

Baptist, J.N., Gholson, R.K., Coon, M.J. 1963. Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. I. Products of octane oxidation. Biochim. Biophys. Acta. **69** : 40-47.

Beck, A.J., Alcock, R.E., Sewars, A.P., Wilson, S.C., Wang, S.M.-J., Wild, S.R., Jones, K.C. 1995. Long-term persistence of organic chemicals in sewage sludge amended soils : a soil quality perspective. Adv. Agron. **55**.

Beck, A.J., Johson, D.L., Jones, K.C. 1996. The form and bioavaibility of non-ionic organic chemicals in sewage sludge-amended agricultural soils. The Sci. of the total Environm. **185** : 125-149.

Bellin, C.A., O'Connor, G.A., Jin, Y. 1990. Sorption and degradation of pentachlorophenol in sludge-amended soils. J. Environ. Qual. **19** : 603-608.

Bird, C.W., Lynch, J.M. 1974. The metabolism of hydrocarbons by microorganisms. Chem. Soc. Rev. **3** : 309-328.

Bisaillon, J-G., Paquette, G., Lépine, F. 1998. Évaluation du traitement biologique de sols contaminés par des hydrocarbures par l'addition de boues biologiques de raffinerie de pétrole. Dans : Rapport final de l'Institut Armand-Frappier présenté à la compagnie Shell. 205 pages.

Bogardt, A.H., Hemmingsen, B.B. 1992. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlayer technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 2579-2582.

Boldrin, B., Tiehm, A., Fritzsche, C. 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobaterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. **59** : 1927-1930.

Bossert, I., Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. Dans : Petroleum microbiology. Ed : R.M. Atlas. Macmillan Publishing Co. New York. 434-476.

Bossert, I., Robison, P., Nelson, E. 1991. Implications of nitrogen fertilization for *in situ* bioremediation of petroleum-contaminated soils. Presentation at the spring ACS meeting, Atlanta, GA.

Bouchez, M., D. Blanchet et J.P. Vandecasteele. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and defined strain associations : Inhibition phenomena and cometabolism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 : 156-164.

Brown, K.W., Donnely, K.C. et L.E. Deuel Jr. 1984. Effects of mineral nutrients, sludge application rate, and application frequency on biodegradation of two oily sludges. Microbiol. Ecology. **9** : 363-373.

Brown, K.W., Donnely, K.C., Thomas, J.C., Davol. P., Kampbell, D. 1985. Degradation of soil organic compounds from three petroleum wastes. Waste Manag Res. **3** : 27-39.

Bruce, A.M., Davis, R.A. 1989. Sewage sludge disposal : current and future options. Water Sci. Technol. **21** : 1113-1128.

Bruce, K.D., Hiorns, W.D., Hobman, J.L., Osborn, A.M., Strike, P., Ritchie, D.A. 1992. Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 3413-3416.

Calder, L.N. 1997. Site remediation and risk assessment in Canada : a perspective from the canadian petroleum industry. Dans : Proceedings of the 6th Symp. And Exhibition on Groundwater and Soil remediation. Alberta. : 5-19

Caldini, G., Cenci, G., Manenti, R., Morozzi, G. 1995. The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilise chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechn. **44** : 225-229.

Carson, D.B., Heitkamp, M.A., Hallas, L.E. 1996. Biodegradation of *n*-phosphonomethyliminodiacetic acid by microorganisms from industrial activated sludge. Can. J. Microbiol. **43** : 97-101.

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 Biotechnol. **4**: 331-338.

Cerniglia, C.E., Heitkamp, M.A. 1989. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Dans : Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. Ed. U. Varanasi, CRC Press, Boca Raton. pp. 41-63.

Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., Lovley, D.R. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. Appl. Environ. Microbiol. **63** : 3589-3593.

Colwell, R.R., Mills, A.L., Walker, J.D., Garcia-Tello, P., Campos-P, V. 1978. Microbial ecology studies of the Metula spill in the Straits of Magellan. J. Fish. Res. Board Can. **35** : 573-580.

Conrad, M.E., Daley, P.F., Fisher, M.L., Buchanan, B.B., Leighton, T., Kashgarian, M. 1997. Combined ^{14}C and $\delta^{13}C$ monitoring of *in situ* biodegradation of petroleum hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. **31** : 1463-1469.

Cooney, J.J. 1984. The fate of petroleum polluants in fresh-water ecosystems. R.M. Atlas (ed.), Dans : Petroleum microbiology. Macmillan publishing Co., New York. 399-434.

Dagher, F., Déziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisaillon, J.-G., Villemur, R. 1996. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. Can. J. Microbiol. **43** : 368-377.

De Jonge, H., Freijer, J.I., Verstraten, J.M., Westerveld, J. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. Environ. Sci. Technol. **31** : 771-775.

Denome, S.A., Stanley. D.C., Olson, E.E., Young, K.D. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains : complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. J. Bacteriol. **175** : 6890-6901.

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

Eaton, R.W., Chapman, P.J. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene : construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. J. Bact. **174** : 7542-7554.

Effroymson, R.A., Alexander, M. 1991. Biodegradation by a Arthrobacter species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 1441-1447.

Ellis, B., Balba, M.T., Theile, P. 1990. Bioremediation of oil contaminated land. Environ. Technol. **11** : 443-455.

Englande, A.J. Jr., Guarino, C.F. 1992 Toxics management in the chemical and petrochemical industries. Water Sci. Technol. **26** : 263-274.

EPA. 1989. EPA Proposes new sludge regulations : The sludge dilemma. 2 pages

Epstein, E., Taylor, J.M., Chaney, R.L. 1976. Effects of sewage sludge and sludge compost applied to soil on some soil physical and chemical properties. J. Environ. Qual. **5** : 422-426.

Fathepure, B.Z., Vogel, T.M. 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. Appl. Environ. Microbiol. **57** : 3418-3422.

Fedorak, P.M., Westlake, D.W.S. 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.

Floogate, G. 1984. The fate of petroleum in marine ecosystems. R.M. Atlas (ed.), Dans : Petroleum microbiology. Macmillan publishing Co., New York. 355-398.

Freijer, J.I., de Jonge, H., Bouten, W., Verstraten, J.M. 1990. Assessing mineralization of petroleum hydrocarbons in soils in relation to environmental factors and experimental scale. Biodegradation. **7** : 487-500.

Frigon, J.C., Guiot, S.R. 1997. A soil-inoculated sequencing batch reactors for treatment of liquid washings of chlorobenzene-contaminated soils. Affiche présenté au 6th symposium on Groundwater And Soil Remediation. Montréal.

Geoffrion, M. 1981. Traitement des eaux usées. Causerie technique. Shell Canada Limité, raffinerie de Monttréal-Est.

Gibson, D.T., Subramanian, V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Dans : Microbial degradation of organic compounds. Gibson D.T . (eds). New York : Marcel Dekker. 181-252.

Gibson, D.T., Zylstra, G.J, Chauhan, S. 1990. Biotransformation catalysed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* F1. Dans : *Pseudomonas* : Biotransformations, pathogenesis and evolving biotechnology. pp. 121-132.

Gigliotti, G., Giusquiani, P.L., Businelli, D., Macchioni, A. 1997. Composting changes of dissolved organic matter in a soil amended with municipal waste compost. Soil Sci. **162** : 919-926.

Glaser, J.A. 1991. Nutrient-enhanced bioremediation of oil contaminated shoreline. The Valdez experience. Dans : On site bioreclamation. Hinchee, R.E. et R.F. Olfenbuttel (Eds). Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. 336-384.

Grosser, R.J., Warshaawsky, D., Vestal, J.R. 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene and carbazole in soils. Appl. Environ. Microbio. **57** : 3462-3469.

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

Grund, E., Denecke, B., Eichenlaub, R. 1992. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 1874-1877.

Guengerich, F.P. 1993. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals. Drug Metab. Dispos. **21** : 1-6.

Haines, J.R., Alexander, M. 1974. Microbial degradation of high-molecular weight alkanes. Appl. Microbiol. **28** : 1084-1085.

Hall, M., Grover, P.L. 1990. Polycyclic aromatic hydrocarbons : metabolism, activation and tumour initiation. Dans : Chemical carcinogenesis and mutagenesis. Berlin :Springer-Verlag, Cooper CS, Groover PL (eds). **1** : 327-372.

Hart, H., Conia, J-M. 1991. Introduction à la chimie organique. France. InterÉditions (eds). 527 pages.

Haüsler, A., Müller-Hurtig, R., Wagner, F. 1992. Influence of chemicals and biosurfactants on the microbial degradation of a fuel oil spill. Dans : DECHEMA Biotechnology Conference 5. Verlagsgesellschaft. pp. 1037-1041.

Heitkamp, M.A, Franklin, W., Cerniglia, C.E. 1988a. Microbiol metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : Isolation and characterisation of a pyrene degrading bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **54** : 2549-2555.

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

Hinchee, R.E., Arthur, M. 1991. Bench-scale studies of the soil aeration process for bioremediation of petroleum hydrocarbons. Appl. Biochem. Biotechnol. **28/29** : 901-906.

Huddleston, R.L., Cresswell, L.W. 1976. Environmental and nutritional constraints of microbial hydrocarbon utilization in the soil. Dans : Proccedings of the 1975 engeneering foundation conference : The role of microorganisms in the recovery of oil. Washington. 71-72.

Huesemann, M.H., Moore, K.O. 1993. Compositional changes during landfarming of wheathered Michigan crude oil-contaminated soil. J. Soil Contam. **2** : 245-264.

Inoue, A., Horikoshi, K. 1991. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter LogP. J. Ferm. Bioeng. **71** : 194-196.

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

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

Kadlubar, F.F., Hammons, G.J. 1987. The role of cytochrome P-450 in the metabolism of chemical carcinogens. Dans : Mammalian cytochromes P-450. Guengerinch FP (eds), Boca Raton, FL : CRC Press. **2** : 81-130.

Kästner, M., Lotter, S., Heerenklage, J., Breur-Jammali, M., Stegmann, R., Mahro, B. 1995. Fate of ^{14}C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured oil. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43** : 1128-1135.

Katterman, F.R.H., Day, A.D. 1989. Plant growth factors in sewage sludge. Biocycle. **3** : 64-65.

Kelley, I. Freeman, J.P., Cerniglia, C.E. 1990. Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. Biodegradation. **1** : 283-290.

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

Kennicutt, M.C. 1988. The effect of biodegradation on crude oil bulk and molecular composition. Oil Chem. Pollut. **4** : 89-112.

King, P.J., Perry, J.J. 1975. The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism, *Mycobacterium vaccae*. Can. J. Microbiol. **21** : 85-89.

Kjeller, L.-O., Jones, K.C., Johnston, A.E., Rappe, C. 1991. Increases in the polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin and furan content in soils and vegetation since the 1840s. Environ. Sci. technol. **25** : 1619-1627.

Komatsu, T., Omori, T., Kodama, T. 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene et acenaphthylene by a pure bacterial culture. Biosci. Biotechnol. Biochem. **57** : 864-865.

Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. 1987. Rules of optimisation of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng. **30** : 81-87.

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

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

Lirette, P. 1996. Optimisation de la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire Maîtrise Microbiologie Appliquée. Institut Armand-Frappier. 175 p.

Maeng Ho, J., Sakai, Y., Tani, Y., Kato, N. 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyses the first step of *n*-alkanes oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. J. Bacteriol. **178** : 3695-3700.

Mahaffey, W.R., Gibson, D., Cerniglia, C.E. 1988. Bacterial oxydation of chemical carcinogens : formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. Appl. Microbiol. **54** : 2415-2423.

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

Margesin, R., Schinner, F. 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. Appl. Microbiol. Biotechnol. **47** : 462-468.

Markovetk, A.J. 1981. Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. Crit. Rev. Microbiol. **1** : 225-238

May, S.W., Katoposis, A.G. 1990. Hydrocarbon monoxygenase system of *Pseudomonas oleovolans*. Crit. Rev. Microbiol. **188** : 3-9.

Means, J.C., Wood, S.D., Hassett, J.J., Banward, W.L. 1980. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by sediments and soils. Environ. Sci. Technol. **14** : 1524-1528.

Menn, F.M., Applegate, B.M., Sayler, G.S. 1993. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. Appl. Environ. Microbiol. **59** : 1938-1942.

Miller, R. 1994. Surfactant-enhanced bioavailability of slighty soluble organic compounds. Dans : Bioremediation-science and applications. Skipper, H. (ed). Madison W.I. : Soil Science Society of American Publications.

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

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

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

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

O'Connor, K.E., Dobson, A.D.W., Hartmans, S. 1997. Indigo formation by microorganisms expressing styrene monooxygenase activity. Appl. Environ. Microbiol. **63** : 4287-4291.

Odu, C.T.I. 1978. The effect of nutrient application and aeration on oil degradation in soil. Environ. Pollut. **15** : 235-240.

Otte, M-P. Gagnon, J., Comeau, Y., Matte, N., Greer, C.W., Samson, R. 1994. Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 : 926-932.

Oudot, J., Ambles, A., Bourgeouis, S. Gatellier, C., Sebyera, N. 1989. Hydrocarbon infiltration in human serum and whole blood by high-performance liquid chromatography. Biochem. Int. **4** : 187-194.

Pennell, K.D., Abriola, L.M., Weber Jr, W.J. 1993. Surfactant-enhanced solubilization of residual dodecane in soil columns. Dans : 1. Experimental investigation ES&T **27** : 2332-2340.

Pesce, S.F., Wunderlin, D.A. 1997. Biodegradation of 2,4- and 2,6-diaminotoluene by acclimated bacteria. Wat. Res. **31** : 1601-1608.

Peterson, A.E., Speth, P.E., Schlecht, P. 1988. Effect of sewage sludge application on groundwater quality. Dans : Eleventh Annual Madison Waste Conference, Municipal and Industrial Waste. University of Wisconsin, W.I. pp. 272-285.

Pirnik, M.P., Atlas, R. M., Bartha, R. 1974. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes* : normal and branched alkanes. J. Bacteriol. **119** : 868-878.

Pirnik, M.P. 1977. Microbial oxidation of methyl branched alkanes. Crit. Rev. Microbiol. **29** : 413-422.

Pothuluri, J.V., Heflich, R.H., Fu, P.P., Cerniglia, C.E. 1992a. Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 937-941.

Pothuluri, J.V., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. 1992b. Fungal metabolism of acenaphtalene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 3654-3659.

Prince, R.C. 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments, Crit. Rev. Microbiol. **19** : 217-242.

Pritchard, H.P., Mueller, J.G., Rogers, J.C., Kremer, F.V., Glaser, J.A. 1992. Oil spills bioremediation : experience, lessons, and results frome Exxon Valdez oil spill in Alaska. Biodegradation. **3** : 315-335.

Radwan, S.S, Sorkhoh, N.A., El-Nemr, I.M., El-Desouky, A.F. 1997. A feasibility study on seeding as a bioremediation practice for the oily Kuwaiti desert. J. Appl. Microbiol. **83** : 353-358.

Ramadan, M., El-Tayeb, O.M., M. Alexander, M. 1990. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. Appl. Environ. Microbiol. **56** : 1392-1396.

Raymond, R.L., Hudson, J.O., Jamison, V.W. 1986. Oil degradation in soil. Appl. Environ. Microbiol. **31** : 522-535.

Rehm, C.S., Reiff, I. 1981. Mechanism and occurrence of microbial oxidation of long chain alkanes. Adv. Biochem. Eng. **19** : 175-215.

Rosenberg, E., Ron, E.Z. 1996. Bioremediation of petroleum contamination. Dans : Bioremediation :principles and application . Crawford, R.L. and D.L. Crawford (Eds.). Cambridge University Press.

Rosenberg, E., Legman, R., Kushmaro, A., Alder, E., Abir, H., Ron, E.Z. 1996. Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. J. Biotechnol. **51** : 273-278.

Ryu, B.H., Oh, Y.K., Bae, K.C., Bin, J.H. 1989. Biodegradation of naphthalene by *Acinetobacter calcoaceticus* R-88. Han'guk Nonghwan Hakhoechi. **32** : 315-320.

Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Rice Jackson, L.M., Vipond, T.E., Western, M.M., Wisniewski, H.L. 1997. Crude oil bioremediation and soil ecotoxicity assessment. Environ. Sci. Technol. **31** : 1769-1776.

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

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

Sánchez, L., Díez, J.A., Polo, A., Román, R. 1997. Effect of timing of application of municipal solid waste compost on N availability for crops in central Spain. Biol. Fertil. Soils. **25** : 136-141.

Santodonato, J. 1997. Review ot the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons : relationship to carcinogenicity. Chemosphere. **34** : 835-848.

Scheibenbogen, K., Zytner, R.G., Lee, Trevors, H. J.T. 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. J. Chem. Tech. Biotechnol. **59** : 53-59.

Schell, M.A. 1986. Homology between nucleotide sequences of promoter regions of *nah* and *sal* operons of NAH7 plasmid of *Pseudomonas putida*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **83** : 369-373.

Sherr, E.B., Sherr, B.F. 1987. High rates of consumption of bacteria by pelagic ciliates. Nature (London). **325** : 710-711.

Shuttleworth, K.L., Cerniglia, C.E. 1996. Practical methods for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading microorganisms and the determination of PAH mineralization and biodegradation intermediates. Dans : Manual of environmental microbiology. Ed. ASM Press, Washington. pp 766-775.

Simon, M.J., Osslund, T.D., Saunders, R., Ensley, B.D., Suggs, S., Harcourt, A., Suen, W.C., Cruden, D.L., Gibson, D.T., Zylstra, G.J. 1993. Sequences of genes encoding naphthlene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. Gene **127** : 31-37.

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

Stringfellow, W.T. et M.D. Aitken. 1995. Competitive metabolism of naphtalene, methylnaphtalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 357-362.

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

Sutherland, J.B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. J. Ind. Microbiol. **9** : 53-62.

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

Takizawa, N., Kaida, N., Torigoe, S., Moritani, T., Sawadw, T., Satoh, S., Kiyohara, H. 1994. Identification and characterisation of gene encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. **176** : 2444-2449.

Taylor, S.E., Calvin, M. 1987. Hydrocarbons from plants : biosynthesis and utilization. Comments Agric. & Foods Chem. **1** : 1-26.

Tiehm, A., Zumft, W.G. 1992. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons-solubilizing potential and biological efficiency of technical surfactants. Dans : DECHEMA Biotechnology Conference 5. VCH Verlagsgesellschaft. pp. 1029-1032.

Tiehm, A., C. Frizsche. 1995. Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *mycobacterium* sp. Appl. Microbiol. Biotehcnol. 42 : 964-968.

Thai, L.T., Maier, W.J. 1992. Solubilization and biodegradation of octadecane in the presence of two commercial surfactants. Dans: 47 th Purdue Industrial Waste Conference Proceding. Lewis Publishers. pp. 167-175.

Toccalino, P.L., Johnson, R.L., Boone, D.R. 1993. Nitrogen limitation and nitrogen fixation during alkane biodegradation in a sandy soil. Appl. Environ. Microbiol. **59** : 2977-2983.

Traxler, R.W. 1973. Bacterial degradation of petroleum materials in low temperature marine environments. Dans : The microbial degradation of oil polluants. Ed. Ahearn, D.G. et S.P. Meyers. Center for Wetland resources, Louisiana State University. pp.163-170.

Utkin, I.B., Yakimov, M.M., Matveeva, L.N., Kozlyak, E.I., Rogozhin, I.S., Solomon, Z.G., Bezborodov, A.M. 1990. Catabolism of naphthalene and salicylate by *Pseudomonas fluorescens*. Folia. Microbiol. **8** : 557-560.

van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G. et B. Witholt. 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. Biodegradation. **5** : 161-174.

Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., Trevors, J.T. 1993a. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants : structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from oil. Can. J. Microbiol. **39** : 1071-1078.

Van Dyke, M.I., Gulley, S.L., Lee, H., Trevors, J.T. 1993b. Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic polluants from soil. Can. J. Ind. Microbiol. **11** : 163-170.

van Ginkel, C.G., Vandenbroucke, K.L., Stroo, C.A. 1997. Biological removal of EDTA in conventional activated-sludge plants operated under alkaline conditions. Biores. Technol. **59** : 151-155.

Vecchioli, G.I., Costanza, O.R., Giorgieri, S.A., Remmler, M. 1997. Extent of cleaning achievable by bioremediation of soil contaminated with petrochemical sludges. Chem. Tech. Biotechnol. **70** : 331-336.

Verstraete, W., Vanlooke, R., deBorger, R, Verlinde, A. 1976. Modelling of the breaking and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. Dans : Procceding of the Third International Biodegradation Symposium. Applied Science Publishers. pp 98-112.

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

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

Wang, M., McGrath, S.P., Jones, K.C. 1995. Chlorobenzenes in field soil with a history of multiple sewage sludge applpications. Environ. Sci. Technol. **29** : 356-362.

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

Warshawsky, D., Keenan, T.H., Reilman, R., Cody, T.E., Radike, M.J. 1990. Conjugaison of bezo[a]pyrene metabolites by freswater green algae *Selenastrum capricornutum*. Chem. Biol. Interact. **74** : 93-105.

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

Weissenfels, W. D., Beyer, M. , Klein, J., Rehm, H.J. 1991. Microbial metabolism of fluoranthene : isolation and identification of a ring fission products. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34** : 528-545.

Weissenfels, W. D., Klewer, H.-J., Langhoff, J. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles : influence on biodegrability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36** : 689-696.

Whyte, L. G., Bourbonnière, L., Greer, C.W. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. Appl. Environ. Microbiol. **63** : 3719-3723.

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

Wild, S.R., Waterhouse, K.S., McGrath, S.P., Jones, K.C. 1991. Organic contaminants in a agricultural soil with a known history of sewage sludge amended polycyclic aromatic hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. **24** : 1706-1711.

Wiggins, B.A., Jones, S.H., Alexander, M. 1987. Explanation for the acclimatation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. Appl. Environ. Microbiol. **53** : 791-796.

Wilson, S.C., Jones, K.C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (HAPs) : a review. Environ. Pollut. **81** : 229-249.

Wrenn, B.A., Venosa, A.D. 1995. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. Can. J. Microbiol. **42** : 252-258.

Yen, K.M., Gunsalus, I.C. 1982. Plasmid gene organization : naphthalene/salicylate oxidation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79** : 874-878.

Yen, K.M., Serdar, C.M. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. CRC Crit. Rev. Microbiol. **15** : 247-268.

Young, L.Y., Cerniglia, C.E. 1995 Chemical contamination of the environment : source, types and fate of synthetic organic chemicals and Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. Dans : Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley-Liss, New York. pp 27-76 et pp 269- 306.

Zaidi, B.R., Murakami, Y., Alexander, M. 1989. Predation and inhibitors in lake water affect the success of inoculation to enhance biodegradation of organic chemicals. Environ. Sci. Technol. **23** : 859-863.

Zhang, Y., Miller, R.M. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant. Appl. Environ. Microbiol. **58** : 3276-3282.

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

Zierath, P.L., Hassett, J.J., Banward, W.L. 1980. Sorption of benzidine by sediments and soils. Soil Sci. **129**: 277-281.

Zobel, C.E. 1973. Bacterial degradation of mineal oils at low temperature. Dans : The microbial degradation of oil polluants. Ed. Ahearn, D.G. et S.P. Meyers. Center for Wetland resources, Louisiana State University. pp 153-161.

Remerciements :

J'aimerais remercier tout particulièrement les personnes suivantes :

D[r] Jean-Guy Bisaillon pour sa disponibilité, sa patience et sa compréhension tout au long de mon projet de maîtrise.

Louis Racine, pour son support technique, sa joie de vivre et son oreille attentive.

Sylvain Milot, pour avoir partagé ses connaissances et pour m'avoir procuré un support technique grandement apprécié.

Francine Turcotte, pour sa patience et son soutien technique.

Mes parents et mon oncle pour leur encouragement, leur support moral, leur intérêt et leur patience.

Philippe- Antoine, mon meilleur ami, pour ses conseils, nos échanges.

Pierre Juteau pour ces bons conseils.

Tous les chercheurs du Groupe de Microbiologie de l'Environnement, D[r] François Lépine, D[r] Réjean Beaudet et D[r] Richard Villemur, pour leurs opinions et leurs suggestions.