UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

ERIC BOURDON

ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

AOÛT 1994

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES..... iii

LISTE DES TABLEAUX.....viii

LISTE DES FIGURES..... ix

SOMMAIRE.....xiii

INTRODUCTION..... 1

REVUE DE LITTÉRATURE..... 4

1. DESCRIPTION ET NOMENCLATURE DES HYDROCARBURES.... 5
1.1 Description..... 5
1.2 Nomenclature..... 5

2. SOURCES D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT..... 6

2.1 Sources naturelles..... 6
2.2 Sources anthropogéniques..... 6

3. DESTINÉE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT..... 7

3.1 Distribution..... 7
3.2 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement.. 8
3.2.1 Volatilisation et hydrolyse..... 8
3.2.2 Adsorption..... 9
3.2.3 Bioaccumulation et toxicité..... 10
3.2.4 Dégradation abiotique des HAPs dans l'environnement..... 11
3.2.4.1 Photolyse..... 11
3.2.4.2 Oxydation..... 12

4. BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES..... 12

4.1 En condition aérobie..... 14
4.1.1 Nutriments..... 15
4.1.2 Température..... 17
4.1.3 Isolement de souches utilisant les hydrocarbures..... 18

4.2 Condition d'anaérobie..... 21
4.2.1 Potentiel de la fermentation méthanique..... 22
4.2.2 Condition de dénitrification..... 24
4.2.2.1 Description et importance de la dénitrification..... 24
4.2.2.2 Potentiel de la dénitrification..... 24
4.2.2.3 Souches dénitrifiantes..... 26
4.3 Acclimatation des bactéries aux hydrocarbures... 26
4.4 Utilisation de dispersants..... 28

5. APPLICATION: GESTION DES SITES CONTAMINÉS PAR LES HYDROCARBURES ET DES HAPS..... 32

5.1 Traitements chimiques/physiques..... 32
5.1.1 Extraction des vapeurs organiques en pile et *in situ*..... 32
5.2 Traitement thermique..... 33
5.2.1 Incinération..... 33
5.2.2 Désorption thermique..... 33
5.3 Traitements biologiques..... 34
5.3.1 Bioréacteur..... 34
5.3.2 Biodégradation en pile et *in situ*..... 34

MATÉRIELS ET MÉTHODES..... 36

1. PROVENANCE DES SOUCHES..... 37

2. MILIEU DE CULTURE..... 37

2.1 Composition du milieu..... 37
2.2 Conditions d'anaérobie et de dénitrification.... 39

3. QUANTIFICATION ET IDENTIFICATION DES HAPS..... 40
3.1 Analyse par HPLC..... 40
3.1.1 Détermination de la longueur d'onde absorption maximale de chaque HAP..... 41
3.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse.... 41
3.2.1 Séparation, identification et quantification des HAPs..... 41
3.2.2 Extraction des HAPs à partir des différents milieux de culture..... 42

4. ENRICHISSEMENT DES MICROORGANISMES EN BIORÉACTEURS..... 43

4.1 Description des bioréacteurs..... 43
4.2 Nettoyage du sable pour bioréacteurs..... 44
4.3 Démarrage et maintenance des bioréacteurs..... 46
4.4 Analyse des HAPs dans les bioréacteurs..... 47

5. TESTS DE BIODÉGRADATION À PARTIR D'ÉCHANTILLONS PROVENANT DES BIORÉACTEURS..... 48

6. ISOLEMENT DE SOUCHES PURES..... 49

6.1 Essai de mise au point d'un milieu sélectif..... 49
6.1.1 Milieux solides contenant des HAPs..... 49
6.1.2 Test en tube avec goutte d'huile..... 50

7. CARACTÉRISATION DES SOUCHES ISOLÉES..... 51

7.1 Transformation des HAPs sur milieu solide..... 51
7.2 Conservation des souches..... 52
7.3 Caractérisation biochimique et identification... 53

8. TESTS DE BIODÉGRADATION DE HAPS À PARTIR DES SOUCHES PURES EN MILIEU LIQUIDE..... 55

8.1 Détermination de courbes de croissance..... 55
8.2 Essais de biodégradation des HAPs sur sable de silice..... 56
8.2.1 Mise au point de la méthode..... 56
8.2.2 Essais de biodégradation..... 56
8.3 Essais de biodégradation des HAPs en milieu aqueux..... 59
8.3.1 Essai de biodégradation de l'acénaphtylène avec la souche isolée G6..... 59

9. TEST DE PRODUCTIVITÉ DE BIOSURFACTANTS PAR LES SOUCHES PURIFIÉES..... 60

RÉSULTATS..... 62

1. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'ANALYSE DES HAPS PAR HPLC..... 63

2. ADAPTATION ET ENRICHISSEMENT DES MICROORGANISMES À DÉGRADER DES HAPS DANS DES BIORÉACTEURS ANAÉROBIES..... 65

2.1 Evaluation de la capacité de dégradation des HAPs..... 65

3. MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE D'EXTRACTION ET D'ANALYSE DES HAPS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE..... 72

4. ISOLEMENT DE SOUCHES PURES DÉGRADANT POTENTIELLEMENT LES HAPS..... 79

4.1 Essais sur milieux solides avec un HAP comme source de carbone..... 79
4.2 Isolement après enrichissement sur goutte d'huile..... 79
4.3 Test de transformation des HAPs sur milieux solides..... 80
4.4 Caractérisation des souches ayant montré un certain potentiel de transformation des HAPs.... 84

5. ESSAI DE BIODÉGRADATION DES HAPS PAR LES SOUCHES PURIFIÉES..... 89

5.1 Essais de biodégradation des HAPs adsorbés sur sable de silice..... 89
5.1.1 Mise au point de la méthode d'extraction..... 89
5.1.2 Suivi des essais..... 92
5.1.2.1 Essais avec les sept souches actives en anaérobies..... 92
5.1.2.2 Essais des différentes conditions avec la souche G_6..... 95
5.1.2.3 Essais de biodégradation de l'acénaphtylène avec la souche G_6..... 97

6. ESSAIS SUR LA PRODUCTIVITÉ DE BIOSURFACTANTS PAR LES SOUCHES PURIFIÉES..... 98

DISCUSSION..... 100

1. MÉTHODES D'ANALYSES..... 101

2. BIODÉGRADATION ANAÉROBIE DES HAPS DANS LES BIORÉACTEURS..... 103

3. ISOLEMENT DE SOUCHES PURES..... 107

4. ESSAIS DE BIODÉGRADATION AVEC LES SOUCHES PURIFIÉES..... 110

4.1 Essais avec les HAPs adsorbés sur le silice..... 110
4.2 Confirmation de l'activité de transformation des HAPs en milieu liquide..... 110
4.3 Essais avec la souche G_6..... 113

CONCLUSION..... 118

REMERCIEMENTS..... 121

BIBLIOGRAPHIE..... 123

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I — ÉVALUATION DU POTENTIEL DE TRANSFORMATION DES HAPS EN CONDITIONS AÉROBIES SUR MILIEU SOLIDE 82

TABLEAU II — ÉVALUATION DU POTENTIEL DE TRANSFORMATION DES HAPS EN CONDITIONS ANAÉROBIES SUR MILIEU SOLIDE 83

TABLEAU III — CARACTÉRISATION DES SOUCHES SÉLECTIONNÉES LORS DU TEST DE TRANSFORMATION DES HAPS SUR MILIEU SOLIDE ANAÉROBIE 85

TABLEAU IV — CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES DÉTERMINÉES SELON LE TEST API 20E POUR LES SOUCHES SÉLECTIONNÉES PAR LE TEST DE TRANSFORMATION DES HAPS SUR MILIEU SOLIDE ANAÉROBIE 86

TABLEAU V — TENSION DE SURFACE DU SURNAGEANT DE CULTURE ENREGISTRÉE APRÈS 7 JOURS D'INCUBATION DANS DU MILIEU BH CONTENANT 2% DE GLUCOSE 99

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Schéma d'un bioréacteur servant à l'enrichissement des microorganismes. 45

FIGURE 2 : Spectres d'absorbance au spectrophotomètre déterminés entre 235 et 300 nm pour des solutions de 1 g/L de naphtalène, d'acénaphtylène, de fluorène et de phénanthrène dissous dans l'éthanol. 64

FIGURE 3 : Pourcentage de naphtalène, d'acénaphtylène, de fluorène et de phénanthrène solubilisé dans le bioréacteur modèle contenant 10 mg/L de chaque HAP. 66

FIGURE 4 : Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie par les bactéries provenant du bioréacteur H2 en présence ou en absence de tween 60. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C. 68

FIGURE 5 : Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie par les bactéries provenant du bioréacteur H4 en présence ou en absence de tween 60. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C. 69

FIGURE 6 : Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie contenant 0,01% de tween 60 inoculé avec les bactéries provenant du test précédent avec le bioréacteur H2 après 25 jours d'incubation. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C. 70

FIGURE 7 : Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie contenant 0,01% de tween 60 inoculé avec les bactéries provenant du test précédent avec le bioréacteur H4 après 25 jours d'incubation. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C. 71

FIGURE 8 : Effet du nombre d'extractions sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène effectués à partir d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther suivi d'une évaporation sous jet d'azote et d'une resuspension dans un même volume d'acétonitrile auquel est ajouté le standard interne. 74

FIGURE 9 : Effet de la saturation en NaCl et du pH basique sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène effectués à partir d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther suivi d'une évaporation sous jet d'azote et d'une resuspension dans un même volume d'acétonitrile auquel est ajouté le standard interne. 75

FIGURE 10 : Effet de l'évaporation à l'azote sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et de phénanthrène obtenu à partir de l'extraction d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther. Le standard interne a été ajouté après l'extraction. 76

FIGURE 11 : Effet de l'ajout du standard interne avant ou après l'extraction sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et de phénanthrène obtenu à partir de l'extraction d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther. 78

FIGURE 12 : Formation d'une zone claire dans le film d'acénaphtylène autour d'une colonie de la souche G_6 sur milieu BHYT (KNO_3). 81

FIGURE 13 : Courbe de croissance de la souche G_4 dans le milieu BHYT (KNO_3) anaérobie à 29°C et à l'obscurité. La croissance a été évaluée par mesure de densité optique au spectrophotomètre à 540 nm à partir de deux cultures ayant des comptes bactériens initiaux différents. 87

FIGURE 14 : Courbe de croissance de la souche G_6 dans le milieu BHYT (KNO_3) anaérobie à 29°C et à l'obscurité. La croissance a été évaluée par mesure de densité optique au spectrophotomètre à 540 nm. 88

FIGURE 15 : Courbe de croissance des souches I_6, I_7, G_4 et G_6 dans le milieu BHYT (KNO_3) incubé en conditions aérobies dans un incubateur rotatif à 29°C et à l'obscurité. La croissance a été évaluée par mesure de densité optique au spectrophotomètre à 540 nm. 90

FIGURE 16 : Effet de la saturation en NACl et du pH acide du milieu combiné ou non sur le pourcentage de récupération du phénanthrène obtenu à partir de l'extraction à l'éther (1:1)(v:v) d'échantillons de milieu BH (KNO_3) contenant 150 mg/L de phénanthrène adsorbé sur 2 ou 5 grammes de sable de silice. 91

FIGURE 17 : Effet du temps d'agitation sur le pourcentage de récupération du phénanthrène obtenu à partir de l'extraction à l'éther (1:1)(v:v) d'échantillons de milieu BH (KNO_3) contenant 150 mg/L de phénanthrène adsorbé sur 3 grammes de sable de silice. 93

FIGURE 18 : Effet de la stérilisation (121°C, 15 min.) sur le pourcentage de récupération des HAPs à partir de l'extraction à l'éther (1:1)(v:v) d'échantillons de milieu BH (KNO_3) contenant 150 mg/L de phénanthrène adsorbé sur 3 grammes de sable de silice. 94

SOMMAIRE

La mise au point de méthodes d'extraction et d'analyses des HAPs a été réalisée pour le dosage par HPLC et par chromatographie en phase gazeuse du naphtalène, de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène. Des bioréacteurs ont été démarrés en conditions méthanogènes et en conditions de dénitrification à partir de sols contaminés aux hydrocarbures et de boues activées afin de favoriser l'enrichissement en microorganismes capables de dégrader des HAPs. Une activité de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène a été obtenue dans un milieu liquide en conditions dénitrifiantes avec des échantillons provenant des bioréacteurs. L'activité obtenue était 20% plus élevée lorsque 100 mg/L de tween 60 était présent.

Dix-neuf souches provenant des bioréacteurs ou de sols contaminés par des hydrocarbures ont été isolées après croissance sur de l'huile à chauffage et/ou du naphtalène comme seule source de carbone. Douze de ces souches ont démontré une habilité à transformer certains HAPs sur milieux solides incubés en conditions aérobies tandis que sept souches ont démontré cette activité sur milieux anaérobies en conditions de dénitrification. Les souches anaérobies isolées étaient des bâtonnets courts ou moyens appartenant principalement au genre *Pseudomonas* mais aussi au genre *Achromobacter* et *Alcaligens*.

Chaque souche anaérobie a été testée en milieu liquide avec leur HAP respectif adsorbé sur du sable de silice afin de confirmer l'activité obtenue sur milieu solide. Aucune activité de transformation n'a été observée malgré un suivi sur une période de plus de 76 jours.

Plusieurs variables ont ensuite été testées afin d'obtenir une activité en milieu liquide avec l'une de ces souches, soit la souche G_6. La présence de tween, d'Inipol EAP 22, de 0,1% et 0,05% ou 1% et 0,5% de bacto-tryptone et d'extrait de levure respectivement et l'incubation en conditions aérobies ou anaérobies ont été utilisés sans obtenir de confirmation de l'activité bien qu'une coloration jaune-orangé soit apparue dans les milieux incubés en aérobie contenant de l'Inipol suggérant que certaines transformations auraient eu lieu. Deux tests effectués de façon à déterminer si ces souches produisaient un biosurfactant pouvant les aider à solubiliser les HAPs et ainsi à les dégrader, se sont avérés négatifs. Ces résultats suggèrent que la présence d'une flore mixte et possiblement de sol, tel que dans les essais effectués à partir des bioréacteurs, pourrait avoir un rôle important à jouer pour permettre la biodégradation des HAPs en milieu liquide.

INTRODUCTION

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) proviennent de diverses activités industrielles: combustion d'énergie fossile, raffineries... Ils représentent la matière première pour la synthèse d'un nombre élevé de composés tels que la peinture, les plastiques et les pesticides. De par leurs propriétés physico-chimiques, les HAPs s'adsorbent aux particules en suspension dans l'air et dans l'eau et se retrouvent largement distribués dans l'environnement, notamment dans les sols et les sédiments, où étant relativement stables, ils s'accumulent jusqu'à des concentrations présentant une forte toxicité et mettent en danger la faune et la flore. Le biotraitement des sols pollués est une technologie nouvelle qui offre de grandes possibilités.

Des microorganismes aérobies, capable de minéraliser les HAPs, ont déjà été isolés. À notre connaissance, aucune souche bactérienne, capable de dégrader les HAPs en conditions anaérobies, n'a été isolée. Comme les HAPs se retrouvent souvent dans des sédiments ou des sols ne contenant pas ou très peu d'oxygène, ce projet s'est intéressé au potentiel inexploité des microorganismes impliqués dans la dégradation des HAPs en conditions anoxiques et plus précisément en conditions de dénitrification, puisque les conditions méthanogéniques n'ont pour le moment démontré aucun potentiel de dégradation des HAPs.

Le traitement aérobie de sols contaminés aux hydrocarbures nécessitent souvent des travaux d'excavation des sols, de mise en pile ou en réacteur, d'aération, de traitement des effluents gazeux... etc qui finissent par être très coûteux. La possibilité de traitement *in situ* en conditions de dénitrification offre plusieurs avantages par rapport au traitement aérobie notamment au niveau des coûts de traitement. Malheureusement, les connaissances concernant la biodégradation anaérobie sont très limitées.

L'isolement et la caractérisation de microorganismes pouvant dégrader des HAPs en conditions de dénitrification et l'étude de leur métabolisme permettrait d'acquérir des connaissances importantes permettant éventuellement le développement de procédés anaérobies de traitement des sols. Le plan de travail envisagé dans cette étude vise la mise au point de méthodes permettant d'étudier la biodégradation des hydrocarbures et la recherche des microorganismes impliqués. Les principaux objectifs étaient: (1) de mettre au point des méthodes d'analyse de quatre HAPs, soit le naphtalène, l'acénaphtylène, le fluorène et le phénanthrène; (2) d'adapter et d'enrichir des microorganismes à dégrader ces quatre HAPs; (3) d'isoler et de caractériser des microorganismes capables de dégrader ces hydrocarbures en conditions anaérobies et (4) d'étudier le potentiel de dégradation de certaines souches.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Description et nomenclature des hydrocarbures

1.1 Description

Les hydrocarbures sont des composés ne comportant que des atomes de carbone et d'hydrogène, ils sont les principaux constituants des pétroles et des gaz naturels. Il existe trois principales catégories d'hydrocarbures, qu'on distingue selon les types de liaisons carbone-carbone des molécules (Hart et Conia, 1987).

1.2 Nomenclature

Il y a les composés **saturés** aliphatiques (alcanes) et cycliques (cyclanes) qui ne comportent que des liaisons simples, les composés **insaturés** qui possèdent au moins une liaison multiple, double (alcènes) ou triple (alcynes) et enfin les composés **aromatiques** qui constituent une catégorie particulière de composés insaturés cycliques, leur structure hybride n'ayant ni simple, ni double liaison, mais un seul type, intermédiaire, de liaison carbone-carbone. C'est ce qui leur confère des propriétés chimiques particulières telle qu'une énergie de résonance (de stabilisation) importante (36 kcal/mole) permettant au benzène (modèle monocyclique) et aux autres composés aromatiques de réagir de manière à conserver leur structure aromatique et à retenir ainsi cette énergie de

résonance (Hart et Conia, 1987). Ces hydrocarbures aromatiques peuvent être monocycliques (HAM) (ex. benzène) ou polycycliques (HAP) (ex. naphtalène).

Les HAPs sont formés de noyaux aromatiques qui sont condensés, c'est-à-dire ayant en commun deux ou plusieurs atomes de carbone.

2. Sources d'hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement

Les HAPs présents dans l'environnement proviennent de sources naturelles et anthropogéniques (CNRC, 1983).

2.1 Sources naturelles

Certains champignons, bactéries, plantes supérieures et animaux sont capables de synthétiser des quinones polycycliques (Thompson, 1971) pouvant servir de précurseurs de HAPs durant la diagénèse. Certains auteurs ont aussi suggéré qu'une biosynthèse complète était possible, mais il existe une controverse à ce sujet. De plus, cet apport par biosynthèse est considéré non important en comparaison à l'apport global. (CNRC, 1983)

2.2 Sources anthropogéniques

Un mélange de nombreux hydrocarbures complexes contenant

de fortes concentrations de HAPs, le goudron de houille, est obtenu comme sous-produit lors du chauffage du charbon en absence d'air effectué pour la fabrication de coke utilisé en grande quantité dans l'industrie de l'acier (Hart et Conia, 1987). Cependant, la majorité des hydrocarbures aromatiques proviennent du pétrole (plus de 70%). Ils représentent la matière première pour la synthèse d'un nombre élevé de composés tels que les colorants, les peintures, les plastiques, les pesticides, l'essence des voitures et des avions (Young, 1984). Les HAPs sont produits lors de la pyrolyse à haute température des hydrocarbures (Enzminger et Ahlert, 1987) et lors d'une combustion incomplète de matière végétale (Higgins et Gilbert, 1978).

Leur présence est donc le résultat de la combustion (haute température), de la diagénèse (basses températures, moins de 150°C) et de la biosynthèse (CNRC, 1983).

3. Destinée des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement

3.1 Distribution

Les HAPs sont très dispersés dans l'environnement, leur présence ayant été détectée aussi bien dans des tissus végétaux qu'animaux, des sédiments, dans le sol, l'air et l'eau de surface (Radding *et al.* 1976).

3.2 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

Le développement du transport maritime des hydrocarbures et de l'exploitation des champs pétrolifères en mer ont entraîné depuis une vingtaine d'années la multiplication de déversements accidentels massifs de produits pétroliers (Sirvins et Tramier, 1985). Après un déversement en mer, qu'elle provienne d'un pétrolier ou d'une plate-forme de forage, l'huile brute subit les effets des conditions environnementales, soit la solubilisation des composés polaires, l'évaporation des composés volatils, la photo-oxydation et l'auto-oxydation (Higgins et Gilbert, 1978). Dépendant du type d'huile, entre 24 et 40% de la dégradation s'effectue de façon abiotique, tandis que la majorité provient de la digestion microbienne (Atlas, 1975).

3.2.1 Volatilisation et hydrolyse

Les composés possèdant deux anneaux tels le naphtalène et le fluorène ont la pression de vapeur la plus élevée des hydrocarbures aromatiques polycycliques. La volatilisation pourrait donc être un procédé important de transport de ces composés (EPA, 1979). Par contre comme les HAPs ne possèdent pas de groupes suceptibles d'être hydrolysés, l'hydrolyse n'est pas considérée importante dans le devenir des HAPs (Radding *et al.*, 1976).

3.2.2 Adsorption

Les HAPs sont largement distribués dans l'environnement et sont transportés sous forme adsorbée sur des particules en suspension dans l'air et l'eau. Les coefficients de partition log octanol/eau calculés par Radding *et al.* (1976) pour le naphtalène (3.37) et le phénanthrène (4.46) et par Léo *et al.* (1971) pour le fluorène (4.18) et l'acénaphthylène (4.07) n'étant pas extrêmement grands, cela indique que pour la plupart des hydrocarbures aromatiques polycycliques, l'adsorption est probablement le procédé de transport dominant en milieu aquatique, ces composés devant être fortement adsorbés sur la matière particulaire en suspension (EPA, 1979).

Les complexes formés des HAPs et de la matière organique dissoute dans l'eau étant suffisamment stables pour établir des constantes d'association (K_B), les études de Morehead *et al.* (1986) ont permis de déterminer que le K_B était plus dépendant de la source de la matière organique dissoute que de la solubilité des HAPs, bien qu'une corrélation avec la solubilité existe pour un même échantillon d'eau. Les contaminants hydrophobes organiques dissous, étant partiellement liés par de fines particules et de la matière organique dissoute, ont une biodisponibilité réduite (Morehead *et al.*, 1986).

3.2.3 Bioaccumulation et toxicité

Des études en conditions réelles et en écosystèmes modèles ont révélé que les HAPs s'accumulent dans les tissus des organismes aquatiques à des concentrations dépassant celles des eaux ambiantes (CNRC, 1983). Giddings *et al.* (1977) ont observé dans un étang modèle une concentration croissante de ^{14}C-anthracène dans les sédiments, la végétation et les animaux, des concentrations allant jusqu'à 10^3 fois celle de l'eau ayant été retrouvées (CNRC,1983). De plus, une fois cette accumulation réalisée, les HAPs peuvent demeurer relativement intacts dans les sédiments dépourvus d'oxygène qui ne sont pas perturbés (CNRC, 1983). Sato *et al.*, 1983 ont observé une augmentation de la mutagénicité des sédiments contaminés par les HAPs. Un aspect important du devenir des HAPs dans l'environnement est l'importance de leur accumulation à des concentrations toxiques dans les tissus des organismes aquatiques. Cela affecte autant la santé de l'homme que celle des animaux, car il y a exposition aux HAPs par la consommation de ces organismes (CNRC,1983).

L'EPA (U.S. Environmental Protection Agency) a classé 16 HAPs comme polluants prioritaires devant être dosés dans les effluents industriels (Keith et Teillard, 1979). Mortelmans *et al.* (1986) ont démontré que la plupart des HAPs de haut poids moléculaire ont des effets de mutagénicité, de génotoxicité et

un potentiel cancérigène tandis que Mix (1986) a démontré qu'une exposition chronique aux HAPs plus légers est cancérigène. De plus, quelques HAPs tel que le naphtalène montre une toxicité aigue (Darville et Wilhm,1984) pouvant inhiber la respiration mitochondriale (Struble et Harmon, 1983).

3.2.4 Dégradation abiotique des HAPs dans l'environnement

Lorsque des hydrocarbures ou des huiles brutes sont déversés dans l'environnement, ces mélanges subissent des changements de leur composition chimique. Les HAPs subissent les réactions caractéristiques des molécules aromatiques, y compris la substitution électrophile, l'addition en position - 1,2 et en position-1,4 ainsi que l'addition-élimination (Tipson, 1964; USNAS, 1972).

3.2.4.1 Photolyse

La majorité des HAPs absorbent fortement les radiations solaires de longueurs d'onde supérieures à 300 nm et ils peuvent ainsi subir une photolyse ou une photo-oxidation directe (Radding *et al.* 1976). En présence de lumière et d'oxygène, les HAPs subissent facilement la photo-oxydation car leur absorption est élevée dans la bande de 200 à 400 nm. Les intermédiaires primaires de la photo-oxydation sont des endoperoxydes qui, par photolyse plus poussée ou par

dégradation thermique, subissent la désalkylation et l'ouverture des noyaux aromatiques (CNRC, 1983). La photolyse directe représenterait une part importante de la dégradation de ces composés en milieu aqueux et ce particulièrement pour le naphtalène, sa solubilité aqueuse étant relativement élevée (34.4 mg/L à 25 °C) (Radding *et al.* 1976).

3.2.4.2 Oxydation

Dans les eaux naturelles les principaux agents pouvants oxyder les HAPs sont: (1) les alkyles de peroxide et les hydroperoxides, générés par clivage photolytique de composés carbonés à l'état de trace ou par des sources enzymatiques, et (2) l'oxygène sous sa forme radicalaire. L'oxydation principale des HAPs proviendrait de l'oxygène sous sa forme radicalaire impliqué dans la photolyse directe (CNRC, 1983), telle que mentionnée ci-haut.

4. Biodégradation des hydrocarbures

La dégradation microbienne de composés organiques peut s'effectuer jusqu'à ce qu'il y ait minéralisation complète en dioxyde de carbone, eau, éléments inorganiques et protéines cellulaires. Les produits ultimes du métabolisme aérobie sont le dioxyde de carbone et l'eau tandis que sous des conditions anaérobies, l'activité métabolique peut produire des substances organiques incomplètement oxydées telles que des acides

organiques aussi bien que d'autres produits tels que le méthane et l'hydrogène sous forme gazeuse (Sims *et al.*, 1990).

Le taux de dégradation microbienne dépend de l'interaction de plusieurs facteurs tels que la composition de l'huile, la température, la pression hydrostatique, la disponibilité de l'oxygène et des nutriments ainsi que du type et du nombre de microorganismes dégradant les hydrocarbures. Les faibles taux de nitrate et de phosphate trouvés dans l'eau de mer non polluée semblent être un facteur limitant le taux de croissance des bactéries sur l'huile brute (Higgins et Gilbert, 1978), une stimulation de la biodégradation et de la croissance ayant été obtenue en réponse à une addition de ces composés (Le Petit et Barthelemy, 1968). Cette réponse ne put être obtenue avec un seul composé à la fois (Gibbs, 1975).

Les HAPs étant des contaminants organiques et hydrophobes, les systèmes terrestres sont connus pour offrir de bien meilleures conditions pour la bioremédiation que les systèmes aquatiques (EPA, 1979). Comme plusieurs enzymes nécessaires à la biodégradation ne sont pas relâchés par les cellules microbiennes, les substances à être dégradées doivent entrer en contact ou être introduites dans la cellule (Sims *et al.*, 1990). Par exemple on suppose que le fait que les HAPs pentacycliques (benzo[a]pyrène et dibenzo[a,h]-anthracène) ne soient pas dégradés (Herbes, 1981) peut résulter, en partie,

d'une adsorption tellement forte de ces composés sur les sédiments qu'ils sont très peu accessibles aux microorganismes présents dans l'eau interstitielle (CNRC, 1983).

4.1 En condition aérobie

L'étape initiale de la principale voie du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques effectuée par des bactéries ou des champignons implique l'oxydation du substrat par une oxygénase, mono-oxygénase pour les aliphatiques et di-oxygénase pour les HAPs (Higgins et Gilbert, 1978), laquelle requiert de l'oxygène moléculaire (Leahy et Colwell, 90).

La disponibilité de l'oxygène dans le sol dépend du taux de consommation par les microorganismes, du type de sol, de sa saturation en eau et de la présence de substrat qui pourrait amener l'épuisement de l'oxygène présent (Bossert et Bartha, 1984). Par exemple, un sol argileux, retenant généralement plus d'eau, limite la diffusion de l'oxygène, tandis qu'un sol riche en matière organique peut amener l'épuisement de l'oxygène par l'augmentation de l'activité microbienne (Sims *et al.*,1990).

4.1.1 Nutriments

Le métabolisme et la croissance des microorganismes dépendent de la présence de quantités adéquates de macro- et de micronutriments. Ces nutriments doivent être disponibles pour les microorganismes (i) sous une forme utilisable (ii) selon des concentrations appropriées et (iii) ceci dans le bon rapport (Sims *et al.*, 1990). L'utilisation de fertilisant à dissolution lente (*slow-release*) tel que le PSF (*paraffin-supported fertilizer*) contenant du $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$ a permis une augmentation de 38% (P/P) de la biodégradation d'hydrocarbures déversés en mer (Olivieri *et al.*, 1976). Ce fertilisant a été choisi pour sa faible solubilité, qui permet la dissolution lente, préférable à l'utilisation de matrice dont la porosité contrôle le relâchement des fertilisants plus solubles. Ces mêmes auteurs font valoir aussi que la molécule de $MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$, contenant à la fois de l'azote et du phosphore, évite un relâchement déséquilibré des deux éléments, qui pourrait survenir avec un mélange de sels différents.

Des suppléments d'azote et de phosphore peuvent être nécessaires pour la biodégradation des sites dont les contaminants sont riches en carbone (Sims *et al.*, 1990) tel que les HAPs... Le rapport C:N:P recommandé par Sims *et al.* (1990) est de 120:10:1. Dibble et Bartha (1979) recommandent plutôt des rapports C:N et C:P de 60:1 et 800:1 respectivement.

L'accélération de la biodégradation d'huile brute ou de gasoline dans le sol et la nappe phréatique a été démontrée par l'addition d'urée-phosphate, de fertilisants N-P-K, et de sels d'ammonium et de phosphate dans plusieurs études (Dibble et Bartha, 1979 et Leahy et Colwell, 1990). Atlas et Bartha (1972) ont obtenu une augmentation de la biodégradation (70%) et de la minéralisation (42%) de pétrole dans l'eau de mer par une addition combinée de nitrate (10^{-2} M) et de phosphate (3.5 X 10^{-4} M), tandis qu'individuellement, seule une petite amélioration a été notée. Selon Le Petit et N'Guyen (1976), les concentrations de phosphore à employer dépendent de la force ionique de l'eau. Elles sont comprises entre 2 et 8 X 10^{-4} M pour les eaux salées et entre 1.5 et 3 X 10^{-3} M pour les eaux où la salinité est naturellement faible.

Selon Dibble et Bartha (1979), l'extrait de levure augmente la production de CO_2 mais pas la biodégradation des hydrocarbures tandis que les boues provenant d'une usine de traitement des eaux usées à 1% (P/P) diminuent ces deux phénomènes dans un échantillon de terre contenant des hydrocarbures. Par contre, une bactérie isolée de sédiments contaminés par des hydrocarbures, incapable d'utiliser les HAPs comme seule source de carbone et d'énergie, pouvait dégrader le naphtalène, le phénanthrène et le pyrène jusqu'au CO_2 lorsqu'elle était cultivée en présence de peptone, d'extrait de

levure et d'amidon (Heitkamp et Cerniglia, 1988). Un autre exemple de co-métabolisme est cité par Foght et Westlake (1988) qui ont isolé une souche de *Pseudomonas* capable de dégrader le dibenzothiophène en CO_2 lorsque cultivée sur un milieu contenant 1 g/L d'extrait de levure et 1 g/L de protéose peptone ou 5 g/L de glucose. Plus récemment, une souche de *Mycobacterium* isolée d'un site contaminé aux HAPs s'est avérée capable d'utiliser le phénanthrène, le pyrène et le fluoranthène comme seule source de carbone et d'énergie tandis qu'elle ne pouvait dégrader le fluorène qu'en présence de 500 mg/L de peptone et d'extrait de levure (Boldrin *et al.*, 1993).

En l'absence de suppléments nutritifs, les composés aromatiques sont attaqués plus facilement que les composés saturés par des populations naturelles et celles d'un sol déjà contaminé d'un port maritime commercial (Fedorak et Westlake, 1981).

4.1.2 Température

La température influence la biodégradation des résidus pétroliers en agissant directement sur le métabolisme des hydrocarbures par les microorganismes et sur la composition de la microflore (Atlas, 1981). En général, le taux de dégradation augmente avec l'augmentation de la température en relation avec l'augmentation d'activité enzymatique et ceci jusqu'à un

maximum atteint entre 30 et 40 °C (Leahy et Colwell, 1990). Cependant, des bactéries thermophiles utilisant des alcanes ont été isolées (Mateles *et al.* 1967) et Colwell *et al.* (1978) rapportent une dégradation intensive de l'huile brute par des bactéries marines à 3 °C.

4.1.3 Isolement de souches utilisant les hydrocarbures

MacGillivray et Shiaris (1993) ont isolé, à partir de sédiments marins, 31 souches de levures présumément actives face au phénanthrène par la méthode de vaporisation sur plaques et formation d'une zone claire autour des colonies. L'identification de ces levures a permis de voir qu'elles appartenaient principalement au genre *Candida* et *Rhodotorula*, les autres genres isolés étant *Cryptococcus*, *Torulopsis* et *Trichosporon*. De ces souches, treize ont été testées pour confirmer le potentiel de biotransformation du phénantrène, 5 souches ont été ainsi confirmées, il s'agit des souches *Candida krusei*, *C. zeylanoides*, *Tricosporon penicillatum*, *Torulopsis glabrata* et *Rhodoturula rubra* (MacGillivray et Shiaris, 1993).

Cette technique de criblage des bactéries utilisant des hydrocarbures hydrophobes a été mise au point par Kiyohara *et al.* (1982). Ce dernier propose d'utiliser la vaporisation sur des colonies ayant poussé sur des milieux riches puisque la détection du phénotype, par la zone claire, dépend directement

de l'habilité de la bactérie à dégrader le HAP et permet ainsi d'éviter un repiquage des souches sur un milieu minéral. Cette méthode est très pratique car elle permet de cribler un nombre élevé de colonies une fois que les souches sont retirées de leur milieu naturel et elle est plus rapide et moins fastidieuse que les méthodes de criblage individuel (Shiaris et Cooney, 1983). Par contre, avec cette méthode on peut avoir des faux négatifs ou encore des faux positifs, l'utilisation du HAP sur pétri ne signifie pas nécessairement que cela fonctionne *in situ* (Shiaris et Cooney, 1983).

Plusieurs auteurs dont Bogardt et Hemmingsen (1992) utilise une méthode dérivée de la première soit en recouvrant la première couche d'agar d'une seconde couche contenant le HAP. Ainsi, l'étalement des colonies est limité et la zone claire est plus facilement observable (Bogardt et Hemmingsen, 1992). Foght et Westlake (1988) et Heitkamp et Cerniglia (1988) ont isolé par la même méthode une souche de *Pseudomonas* (HL7b) et une souche Gram-positive (non-identifiée) qui se sont avérées capable de minéraliser ou d'oxyder une gamme importante d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et de nombreux dérivés. Par exemple, la souche *Pseudomonas* HL7b était capable de dégrader les HAPs tétracycliques (fluoranthène), tricycliques (anthracène, phénanthrène et fluorène), bicycliques (naphtalène), monocyclique (toluène) ainsi que de

nombreux autres hydrocarbures et composés aromatiques hétérocycliques..

Une souche d'*Alcaligenes* capable de dégrader 2,3 mg de phénanthrène/g de sol pollué non-stérile a été isolée par Moller et Ingvorsen (1993). Par contre, cette souche était incapable de dégrader le phénantrène, bien qu'elle puisse survivre 50 jours, si le sol était préalablement stérilisé. Rozgaj et Glancer-Soljan (1992) ont aussi démontré la nécessité, pour une culture mixte provenant de boues activées d'une usine d'épuration industrielle, de la présence de onze souches différentes en co-culture pour obtenir une dégradation stable de l'acide 6-aminonaphtalène-2-sulphonique. En effet, lorsque les onze souches composant cette culture mixte n'étaient pas toutes présentes, la dégradation n'avait pas lieu ou était perdue lors des cultures suivantes. Aucune des souches pures ne pouvait dégrader l'acide 6-aminonaphtalène-2-sulphonique (Rozgaj et Glancer-Soljan, 1992). Les microorganismes composant cette culture provenait de trois genres, soit: *Flavobacterium*, *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Une revue des espèces bactériennes et fongiques pouvant dégrader les hydrocarbures pétroliers qui sont isolés le plus fréquemment a été effectuée par Bartha et Atlas (1977). Les genres de bactéries comprennent *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*,

Arthrobacter et *Mycobacterium*; les genres appartenant au groupe des champignons incluent *Cladosporium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporium* et *Torulopsis*.

Selon Fedorak et Westlake (1981), la dégradation des composés aromatiques progresse depuis les poids moléculaires faibles et les molécules les moins complexes vers les molécules plus grosses et plus complexes. Selon Foght *et al.* (1989) une certaine hiérarchie de dégradation existerait car ils ont observé que des souches qui ont minéralisé du toluène et du naphtalène, des substances aromatiques respectivement mono- et dicycliques, n'ont pas minéralisé des composés aromatiques tricycliques anthracène et phénanthrène tandis que les souches ayant minéralisé ces derniers ont aussi minéralisé les substrats plus petits.

4.2 Condition d'anaérobie

Dans un procédé aérobie, l'oxygène sert d'accepteur final d'électrons. Dans certains cas où l'oxygène n'est pas disponible, le nitrate (NO_3^-), le fer (Fe^{3+}), le manganèse (Mn^{2+}) et le sulfate (SO_4^{2-}) peuvent servir d'accepteur final d'électrons si les organismes possèdent les systèmes enzymatiques appropriés (Sims *et al.*, 1990). Lovely et Phillips (1988) ont décrit la croissance, en conditions d'anaérobie, par oxydation de composés organiques en dioxyde de carbone, d'un

isolat provenant de sédiments qui utilise comme seul accepteur d'électrons le Fe^{3+}, le Mn^{4+} et le NO_3^-.

Les consortiums bactériens agissant par fermentation méthanique requièrent en général un potentiel d'oxydoréduction de moins de -300 mV pour croître (Evans et Fuchs, 1988). Ces consortiums sont composés de trois types physiologiques de bactéries vivant en symbiose obligatoire, soit les acidogènes ou fermentaires, qui convertissent le substrat initial en acide organique; les acétogènes, protons-réducteurs et les méthanogènes, consommateurs d'hydrogène et d'acétate produisant le méthane.

4.2.1 Potentiel de la fermentation méthanique

Selon une revue publiée par Leahy et Colwell en 1990, il a été démontré dans plusieurs études que la dégradation anaérobie des hydrocarbures s'effectue à des taux négligeables et que sa signification écologique est considérée comme mineure. Cependant la dégradation microbienne de composés aromatiques oxygénés tels que le benzoate et halogénés tels que l'halobenzoate, le chlorophénol et le biphényl polychloré fut démontrée en conditions anaérobies (Leahy et Colwell, 1990). A l'opposé des benzoates et des phénols, les hydrocarbures aromatiques n'ont pas de groupes substitués qui facilitent l'hydratation du cycle... (Zeyer *et al.*, 1986). Ainsi,

plusieurs auteurs ont démontré la stabilité de différents HAPs en conditions d'anaérobie. Mihelcic et Luthy (1988A) n'ont obtenu aucune biodégradation pour le naphtalène et l'acénaphtène en absence d'oxygène durant un test de dix semaines. Bauer et Capone (1985) et Delfino et Miles (1985) ont observé la même stabilité avec le naphtalène et l'anthracène pour des périodes de 112 et 96 jours respectivement.

De récentes études montrent que des consortiums microbiens provenant du sol et de boues sont capables de métaboliser des composés aromatiques monocycliques ou polycycliques substitués tels que le benzène, le xylène et le naphthol en absence d'oxygène moléculaire ou en conditions méthanogéniques (Grbic-Galic et Vogel, 1987 et Mihelcic et Luthy, 1988a). L'hydroxylation du cycle aromatique du benzène et du toluène semble dépendre de l'eau comme source d'oxygène (Grbic-Galic et Vogel, 1987).

En digestion anaérobie, les substances inhibitrices les plus reconnues sont les acides gras volatils, l'hydrogène, l'ammoniac, les métaux lourds, les cations, les sulfites et le H_2S, en plus d'une vaste gamme de composés organiques (Parkin et Owen, 1986).

4.2.2 Condition de dénitrification

4.2.2.1 Description et importance de la dénitrification

La dénitrification est la réduction du nitrate en nitrite puis en oxyde d'azote et enfin en azote gazeux bimoléculaire (N_2) par des microorganismes sous des conditions d'anaérobie et quelquefois en aérobie. Le nitrate peut donc servir d'accepteur final d'électrons lors de la biodégradation de composés organiques (Mihelcic et Luthy, 1988b; Zeyer et al, 1986).

Ce procédé est important car il devrait pouvoir permettre d'extraire le nitrate des déchets ou des eaux contaminées provenant de sources domestiques, industrielles et animales (Knowles, 1982; Francis, *et al.*, 1989) et parce qu'il permet le métabolisme oxydatif de composés organiques en absence d'oxygène (Francis, *et al.*, 1989). De plus, il est responsable de la majorité des pertes en nitrate des sols fertilisés (Knowles, 1982).

4.2.2.2 Potentiel de la dénitrification

Dans ces conditions, Nozawa et Maruyama (1988) a obtenu la dégradation de 12 uM d'o-phthalate lors d'essais réalisés en milieu liquide avec une concentration de 5 g/L de KNO_3. Braun et Gibson (1984) a rapporté qu'en présence de 2 g/L de KNO_3, 5 mM de 2-aminobenzoate furent métabolisés en 30 heures tandis

que Zeyer *et al.* (1986) obtenaient la biodégradation du toluène et du 1,3-diméthylbenzène. Mihelcic et Luthy, (1988a et 1988b), ont obtenu la dégradation d'entre 1 et 10 mg/L de naphthol, naphtalène et d'acénaphthène en moins de neuf semaines. Al-Bashir *et al.* (1990) ont démontré un taux maximal de biodégradation du naphtalène par dénitrification semblable à celui obtenu pour le même composé en conditions aérobies par Bauer et Capone (1988) et Mihelcic et Luthy (1988a), soit environ 1.8 ppm/jour.

Il est à noter qu'à un pH neutre, le processus microbien d'oxydation de solutés organiques, via la dénitrification, n'est que légèrement moins favorable énergétiquement que celui qui implique la respiration aérobie, mais considérablement plus favorable que les procédés anaérobies via la réduction du sulfate ou la fermentation méthanogénique (Morel, 1983). Ceci a été confirmé par Samson *et al.* (1991), qui ont étudié la biodégradation de certains HAPs et ont montré que sous des conditions aérobies ou dénitrifiantes, la biodégradation complète des substances étudiées était obtenue tandis que dans un environnement propice à la réduction des sulphates, les HAPs étaient faiblement dégradés alors qu'aucune dégradation n'était observée en condition de fermentation méthanique. Pour la biodégradation anaérobie des HAPs, la dénitrification semble donc être la voie ayant le plus de potentiel.

4.2.2.3 Souches dénitrifiantes

Le genre *Pseudomonas* inclut les bactéries dénitrifiantes les plus communément isolées du sol (Gamble *et al.*, 1977) et des sédiments aquatiques (Heitzer et Ottow, 1976) et il pourrait être le plus actif dans l'environnement (Knowles, 1982). Un autre genre numériquement important dans les sols serait les *Alcaligenes* (Gamble *et al.*, 1977).

Le prélèvement d'échantillons de sédiments à différentes profondeurs dans le sol (entre 0 et 289 m) effectué par Francis *et al.* (1989) a permis de voir que la microflore indigène des sédiments de surface possède la plus forte activité dénitrifiante. Dans les sédiments plus profonds, l'activité était plus grande dans les échantillons de sable saturé que dans ceux de glaise asséchée.

Il est important de noter qu'à notre connaissance, aucune souche pure pouvant en conditions anaérobies utiliser des HAPs comme seul source de carbone et d'énergie n'a été isolée à ce jour.

4.3 Acclimatation des bactéries aux hydrocarbures

Dans les écosystèmes non pollués par les hydrocarbures, les microorganismes utilisant les hydrocarbures constituent moins de 0.1% de la communauté microbienne tandis que dans les

écosystèmes contaminés aux hydrocarbures, ils peuvent représenter jusqu'à 100% des microoganismes viables (Atlas, 1981).

Une pré-exposition des bactéries aux hydrocarbures permet d'obtenir un bien meilleur rendement de biodégradation. Le taux et le degré de dégradation des HAPs sont supérieurs quand le sol et ces microorganismes ont été préalablement acclimatés aux HAPs (EPA, 1979). En effet, une croissance plus forte survient grâce à une résistance accrue à ces composés. Selon Young (1984), plusieurs composés aromatiques sont inhibiteurs à des concentrations supérieures à 300 mg/L. Cependant, après acclimatation des bactéries, une biodégradation anaérobie peut survenir à des concentrations 6 à 8 fois supérieures. De plus, la transformation de composés tels que le naphtalène, l'anthracène et le benzo[a]pyrène s'effectue dans un temps de 10 à 400 fois plus long avec des bactéries provenant de sédiments non contaminés qu'avec des bactéries provenant de sédiments contaminés aux hydrocarbures (Herbes et Schwall, 1978).

Cette adaptation proviendrait de la relation de trois mécanismes, soit (i) l'induction et/ou la dépression d'enzymes spécifiques, (ii) les changements au niveau génétique qui amènent de nouvelles capacités métaboliques, et (iii) l'enrichissement sélectif d'organismes capables de transformer

le ou les composés d'intérêts (Cork et Krueger, 1991, Spain *et al.*, 1980 et Spain et Van Veld, 1983). Il est maintenant évident que des éléments transposables, des réarrangements de matériels génétiques et des transferts entre souches non reliées peuvent contribuer à l'assemblage de nouveaux plasmides de dégradation (Broda *et al.*, 1981). Des gènes des différentes étapes du catabolisme de dégradation d'un substrat peuvent évoluer dans différents organismes, puis s'assembler dans un seul organisme (Farrell et Chakrabarty, 1979).

Certains auteurs (Bauer et Capone, 1988; Shiaris, 1989) ont montré qu'une pré-exposition à un composé peut amener une augmentation du taux de métabolisme d'un composé de structure similaire. Ce phénomène est appelé une acclimatation croisée (Leahy et Colwell, 1990). Par contre, aucun synergisme ou antagonisme ne fut observé dans une culture combinée constituée d'un isolat dégradant des composés aliphatiques et d'un autre dégradant des composés aromatiques, comparativement aux dégradations par les isolats individuels (Foght *et al.*, 1989).

4.4 Utilisation de dispersant

Wodzinski et Bertonili (1972) et Wodzinski et Coyle (1974) ont déterminé par des tests de croissance bactérienne en présence de différentes concentrations de HAPs utilisés comme seule source de carbone que le naphtalène et le phénanthrène

étaient seulement utilisés sous forme solubilisée. Les HAPs sont très peu solubles dans l'eau à 25 °C, la solubilité du naphtalène, le plus soluble des HAPs, est de 34.4 mg/L (Radding *et al.*, 1976) tandis que la solubilité du phénantrène est de 1,29 mg/L (Mackay et Shiu, 1977). L'utilisation de dispersants augmente significativement leur concentration dans la phase aqueuse (Vigon et Rubin, 1989). Un dispersant modifie la tension interfaciale entre l'hydrocarbure et l'eau de mer, favorisant ainsi l'évaporation, la dissolution et la biodégradation ultérieure des hydrocarbures (Sirvins et Tramier, 1985). De plus, il a été démontré que les surfactants augmentent la désorption des HAPs (Edwards *et al.*, 1991; Jafvert, 1991)

Cependant, l'accélération de la biodégradation par des dispersants ne peut être démontré facilement, des résultats contradictoires ayant été obtenus. Falatko et Novak (1992) ont observé une augmentation de la solubilité des composés de l'essence provenant de l'action de biosurfactants produits lors de la croissance de microorganismes sur deux substrats, soit, l'huile d'olive et l'essence. Par contre, le biosurfactant produit sur l'huile d'olive inhibait la dégradation des composés de l'essence tandis que celui produit sur l'essence n'avait aucun effet significatif sur la dégradation. Gauger *et al.* (1991) n'ont pas observé d'augmentation de la

biodégradation des HAPs de 2 à 6 cycles avec l'utilisation d'un bio-émulsifiant dans des microcosmes de sol sur une période de 365 jours par rapport aux microcosmes correspondant sans bio-émulsifiant. De plus, des problèmes de toxicité face aux bactéries et aux organismes aquatiques furent observés (Pritchard et Costa, 1991). Des cosolvants organiques peuvent avoir un effet sur la biodisponibilité de produits chimiques en augmentant leur solubilité (Dickhut *et al.* 1991). Une autre limitation de l'utilisation des surfactants dans l'environnement est l'adsorption que ces derniers peuvent subir sur les particules de sols (Vigon et Rubin (1989) et McDermott *et al.*, (1989)). Par exemple, le triton X-100 peut être adsorbé de 15 à 20% P/P dans un sol riche en glaise (McDermott *et al.*, 1989). Au départ, les dispersants contenaient des hydrocarbures mais récemment des dispersants à base de solvants oxygénés (cétones, glycol...) se sont révélés particulièrement efficaces (Sirvins et Tramier, 1985).

En 1991, Pritchard et Costa ont démontré que l'application en combinaison d'un fertilisant à dissolution lente et d'un autre, oléophilique, Inipol EAP 22 a permis d'augmenter de 2 à 3 fois le taux de biodégradation des hydrocarbures sur les plages de Prince Williams Sound, polluées lors du déversement de l'Exxon Valdez. L'Inipol EAP 22 produit par la compagnie Elf Aquitaine (Paris, France) est une micro-émulsion stable

composée d'un noyau d'urée (source d'azote) entouré d'un porteur d'acide oléique. Du "laureth phosphate" (surfactant et source de phosphore) est incorporé comme agent stabilisateur et de l'éthanol "butoxique" est additionné comme réducteur de viscosité (Pritchard et Costa, 1991). Ces auteurs suggèrent que l'activité oléophilique de l'Inipol permet de séquestrer les nutriments à l'interface huile-eau de façon à promouvoir la biodégradation.

Guerin et Jones (1988) ont observé une augmentation de la solubilité et de l'utilisation du phénantrène par une souche de *Mycobacterium* lorsqu'ils utilisaient 100 mg/L de Tween 20, 40, 60, 80 ou 85, un surfactant non-ionique. L'utilisation d'une quantité croissante du solvant heptaméthylnonane, de 0 à 250 uL, a amené une augmentation de 14% et 55% de la minéralisation du naphtalène et de l'hexadécane par une souche d'*Arthrobacter* (Effroymson et Alexander, 1991). Ellis *et al.* (1990) ont traité avec succès 2000 m^3 de sol contaminé aux hydrocarbures en ajoutant des microorganismes, des nutriments, de l'oxygène et des surfactants. Le principal surfactant utilisé lors de l'essai *in situ* était le cyanamer P70 (Cyanamid) puisqu'il ne présentait pas de toxicité (LD50, rat, oral>10 g/kg) et qu'il était biodégradable (Ellis *et al.*, 1990). Dans deux essais sur le terrain, ils ont obtenu une réduction des hydrocarbures totaux de 12,980 à 1237 mg/kg en 34 semaines dans un sol excavé

et de 185 à 26 mg/kg dans le traitement *in situ*.

L'addition d'un biosurfactant, un glycolipide de "sophorose", a permis de doubler le taux de dégradation d'un mélange d'hydrocarbures composé de tétradécane, de pentadécane, d'hexadécane, de 1,2,4-triméthylcyclohexane, de pristane et de naphtalène dans un système modèle contenant 10% de sol et 1,35% de ce mélange d'hydrocarbures (Oberbremer *et al.*, 1990).

5. Application: Gestion des sites contaminés par des hydrocarbures et des HAPs

Les informations concernant cette section ont été principalement obtenues d'un document de travail préparé par Shell Canada en 1992.

5.1 Traitements chimiques/physiques

5.1.1 Extraction des vapeurs organiques en pile et *in situ*

Cette technique est un procédé de séparation physique applicable à des sols contaminés par des hydrocarbures légers. Ces derniers sont extraits du sol en maintenant une pression négative puis sont absorbés sur du charbon activé ou traité par oxydation catalytique. Cette technique largement utilisée est relativement efficace et rapide. Les coûts sont d'environs 40 à 80 $/tonne lorsque l'on utilise le charbon activé. Le système d'oxydation catalytique est quant à lui relativement coûteux

(75 000 à 100 000 $).

5.2 Traitement thermique

5.2.1 Incinération

On effectue la combustion des hydrocarbures à des températures de 800 à 1200 °C. Cette technique destructrice est efficace à plus de 99% mais il peut être difficile d'obtenir les autorisations pour opérer un incinérateur pour la destruction des sols contaminés et les coûts s'élèvent à 250 à 300 $/tonne.

5.2.2 Désorption thermique

Les sols excavés sont chauffés de 150 à 370 °C dans un four sans combustion et les effluents gazeux peuvent être brulés dans une chambre secondaire. Cette méthode est essentiellement une technique de séparation qui n'est efficace que pour traiter les sols contaminés à l'essence, au diésel et au kérosène. De plus il peut être difficile d'obtenir les autorisations pour opérer la chambre de combustion secondaire. Les coûts s'élèvent de 100 à 200$/tonne.

5.3 Traitements biologiques

5.3.1 Bioréacteur

Les sols excavés sont fluidisés puis placés dans une série de réacteurs auquels on ajoute des nutriments pour favoriser la biodégradation et des tensioactifs pour favoriser la désorption des contaminants fixés aux particules de sol. Cette technique, bien connue dans le domaine du traitement des eaux usées, est par contre plus lente avec les hydrocarbures lourds et fonctionne mieux avec des sols fins. De plus, il peut être nécessaire de traiter les effluents gazeux et les eaux contaminées et la capacité de traitement est limitée par le volume du réacteur. Les coûts engendrés sont d'environ 80 à 250 $/tonne.

5.3.2 Biodégradation en pile et *in situ*

On effectue la stimulation des microorganismes présents dans le sol par addition de nutriments (potassium, azote et phosphore) et en fournissant de l'oxygène par injection d'air, dissolution de peroxyde d'hydrogène ou encore par l'ajout de solution de nitrates. Ces techniques faciles à mettre en oeuvre nécessitent tout de même des essais d'optimisation et ne sont applicables qu'aux sols contaminés par l'essence, le diésel et le kérosène mais peuvent être combinées avec la technique d'extraction de vapeur pour ventiler le sol. Le processus peut

être limité par la présence de métaux lourds et s'échelonner sur une longue période s'il y a présence de phase d'hydrocarbure libre. De plus, la dégradation dans l'environnement peut ne s'effectuer que partiellement. En effet, les procédés enzymatiques comptant souvent de nombreuses étapes, il peut arriver qu'un contaminant ne soit transformé qu'en un intermédiaire de toxicité plus ou moins forte comparé au composé original. Le but de la biorémédiation de sol contaminé est que la dégradation résulte en une détoxification des composés parentaux en produits qui ne seront plus une menace pour la santé des humains et/ou de l'environnement (Sims *et al.*, 1990). La technique doit être validée au préalable pour l'autorisation d'effectuer ce genre de traitement. L'efficacité varie de 50 à 99% et les coûts varient de 15 à 80 $/tonne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. PROVENANCE DES SOUCHES

Les microorganismes testés ont été obtenus après enrichissement d'un mélange constitué au départ de sols contaminés aux HAPs et des boues de digesteur anaérobie et aérobie. L'échantillon de sol provenait d'une sablière utilisée comme dépotoir par des compagnies pétrolières dans les années 50-60. Les boues utilisées proviennent des digesteurs anaérobie et aérobie de l'usine d'épuration des eaux de la municipalité de Deux-Montagnes (Québec). L'enrichissement des bactéries a été réalisé dans des bioréacteurs à alimentation semi-continue maintenus en conditions anaérobies.

2. MILIEU DE CULTURE

2.1 Composition des milieux de culture

Le milieu de culture (M) a été utilisé lors du démarrage des réacteurs anaérobies. Ce milieu était une modification de celui de Boyd *et al.*(1983). Il contenait, par litre: KH_2PO_4, 0,27 g; NH_4Cl, 0,53 g; $MgCl_2.6H_2O$, 0,10 g; $CaCl_2.2H_2O$, 0,073 g; $FeCl_2.4H_2O$, 0,02 g; solution de minéraux, 10 mL; résazurine, 0,001 g; solution de vitamines, 10 mL; Na_2S, 0,005 g; KNO_3, 2 g (pour dénitrification). Le pH était ajusté entre 7,1 et 7,3 avec une solution de K_2PO_4. La solution de vitamines, le Na_2S et le NaOH (pour l'ajustement final du pH) ont été stérilisés par filtration avec des filtres AcroDisk de porosité de 0,2 μm

(Gelman Sciences, Ann Arbour, Etats-Unis) et ajoutés au milieu après le passage à l'autoclave. La solution de minéraux était composée des éléments suivants, par litre: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,1 mg; $ZnCl_2$, 0,1 mg; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,1 mg; H_3BO_3, 0,1 mg; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0,1 mg. La solution de vitamines contenait, par litre (Wolin *et al.*, 1963): biotine, 2 mg; acide folique, 2 mg; hydrochlorure de pyridoxine, 10 mg; riboflavine, 5 mg; thiamine, 5 mg; acide nicotinique, 5 mg; acide panthoténique, 5 mg; vitamine B_{12}, 0,1 mg; acide *p*-aminobenzoique, 5 mg; acide thioctique, 5 mg.

Un autre milieu minimal (BH) a également été utilisé, soit le milieu Bushnell-Haas (Difco, Détroit). Il contenait par litre: KH_2PO_4, 1,0 g; K_2HPO_4, 1,0 g; NH_4NO_3, 1,0 g; $MgSO_4$ 0,20 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 g; $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 0,05 g. Ce milieu était stérilisé par autoclavage, 15 minutes à 121°C.

Lorsque mentionné, les HAPs (Aldrich, Milwaukee, Etats-Unis); le naphtalène, l'acénaphtylène, le fluorène, le phénanthrène ainsi que les différentes sources de carbone utilisées ont été ajoutés au milieu à des concentrations variables, selon les besoins. Le milieu enrichi le plus fréquemment utilisé était le BHYT (KNO_3), soit le milieu Bushnell-Haas auquel était ajouté 0,5% d'extrait de levure, 1% de Bacto-tryptone et 1 g/L de KNO_3.

2.2 Conditions d'anaérobie et de dénitrification

Lorsque le milieu a été préparé dans le but d'être distribué dans des bouteilles à sérum en verre (Canlab, Pointe-Claire), il a tout d'abord été chauffé jusqu'à ébullition en présence d'une colonne réfrigérante et maintenu ainsi pendant un minimum de 15 minutes avant d'être transféré dans les bouteilles à sérum. Le milieu bouillant a été barbotté 5 minutes par un mélange de gaz contenant 10% de H_2, 10% de CO_2 et 80% de N_2 (Medigas, Ville Saint-Laurent). Les bouteilles ont été hermétiquement fermées avec des bouchons de butyle (Geo-Microbial Technologies, Ochelata, Etats-Unis) ou de butyle recouvert de teflon (Supelco, Oakville, Ontario) lorsqu'un HAP devait être ajouté au milieu après la stérilisation. Le milieu était alors autoclavé pendant 15 minutes à 121°C. Lorsque le milieu était plutôt destiné à l'alimentation des bioréacteurs, il a été préparé dans une bouteille de verre de 4 litres (Fisher, Montréal). Le milieu était alors bouilli avant d'être autoclavé durant 1 heure à 121°C. Les bouteilles étaient ensuite barbottées avec le mélange de gaz, déjà décrit, durant le refroidissement du milieu. Les bouteilles ont été fermées par un bouchon de butyle traversé de différentes tubulures.

3. Quantification et identification des HAPs.

3.1 Analyse par HPLC

Les premières analyses effectuées en vue d'identifier les différents HAPs utilisés ont été faites par chromatographie liquide de haute performance (HPLC). L'équipement utilisé était de marque Waters (Mississauga, Ontario), soit le *System Controller* (modèle 650), un spectrophotomètre (Lambda-Max, modèle 481), un intégrateur (modèle 740) et une colonne hydrophobe radial pak C_{18}. Un volume d'échantillon a été mélangé à un volume égale à 33% d'acétonitrile (qualité HPLC, BDH, Ville St-Laurent). Après agitation, la préparation était centrifugée 5 minutes à 14900 g avec une microcentrifugeuse. Pour séparer les différents HAPS, différentes phases mobiles ont été essayées en mode isocratique à un débit de 2 mL/minute. Entre chaque changement de phase mobile, la colonne était d'abord équilibrée pendant 15 minutes avant la phase mobile suivante. Après que le temps de rétention de chaque HAP ait été déterminé avec la phase mobile permettant la meilleure séparation, des courbes d'étalonnage ont été effectuées. Une régression linéaire a été calculée pour chacune des courbes, à l'aide du logiciel Lotus 123, de façon à déterminer leur pente et ainsi calculer la concentration correspondante à l'air sous la courbe obtenue lors des dosages. Les lectures d'absorbance ont été effectuées à 254 nm (Mihelcic et Luthy, 1988A) ou aux

longueurs d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) spécifique à chaque HAP lorsque nécessaire.

3.1.1 Détermination de la longueur d'onde absorption maximale de chaque HAP.

Une solution de 1 g/L de chaque HAP a été préparée dans l'éthanol (100%) afin d'en mesurer la longueur d'onde d'absorption maximale entre 230 nm et 300 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Canlab, modèle SP6-550).

3.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse

3.2.1 Séparation, identification et quantification des HAPs

L'appareil utilisé était un chromatographe de marque Hewlett Packard, modèle 5890 A, muni d'une colonne capillaire de type DB5 (5% phényle, 95% méthyle de silicone) de 25 mètres de longueur et de 0,2 mm de diamètre interne. L'azote a été utilisé comme gaz porteur à un débit de 2 mL/minute. Les températures de l'injecteur et du détecteur à ionisation de flamme (FID) étaient respectivement 250 et 340°C. Les échantillons ont été injectés en mode de séparation (mode *split*). Le four a été programmé pour que la température s'élève de la façon suivante: de 70 à 210°C à raison de 20°C/minute, de 210 à 285°C à un taux de 10°C/minute puis de 285 à 300°C à raison de 20°C/minute, 300°C étant maintenue pendant 8 minutes.

Après que le temps de rétention de chaque HAP ait été déterminé avec ce programme, divers standards internes potentiels ont été testés afin d'effectuer des courbes d'étalonnage pour chaque HAP. Les différents produits testés (Aldrich sauf exception) ont été: le naphtalène, le dichloro-diphényl trichloréthane (DDT), le 2,4-*bis*(4-chlorophényl)-1,1-dichloroéthane (TDE), le 2-méthylnaphtalène, le 4-phényl-toluène, 1-méthylfluorène, 2-méthylphénanthrène et le biphényl et le pyrène (Sigma, St-Louis).

3.2.2 Extraction des HAPs à partir des différents milieux de culture.

Chaque extraction a été effectuée avec un ratio échantillon:éther de 1:1 (v:v). L'effet du temps d'agitation au vortex (0 à 120 secondes); du pH du milieu (pH = 2, 7,1 et 10); de la concentration en NaCl (normal ou saturé); de l'évaporation à l'azote suivi d'une resuspension dans l'acétonitrile et du nombre d'extraction (1 ou 2) ont été évalués pour mettre au point une méthode d'extraction des HAPs à partir des différents milieux de culture.

Lors de ces essais, le naphtalène puis le pyrène ont été utilisés comme standard interne à une concentration finale de 150 mg/L pour l'analyse par GC des autres HAPs. Dix microlitres de naphtalène dissout dans de l'acétonitrile (7,5 g/L) était

ajouté au milieu avant l'extraction ou après l'extraction à l'éther récupéré afin de corriger les variations au niveau de l'extraction des HAPs et de l'injection au GC. Les HAPs, acénaphtylène, fluorène et phénanthrène étaient dissous dans du méthanol (25 g/L) et ajoutés à une concentration finale de 100 mg/L dans du milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 pour les essais avec le naphtalène comme standard interne. Ces essais ont tous été effectués en duplicata.

Lors des essais avec le pyrène comme standard interne, les HAPs étaient adsorbés sur du sable de silice dans un milieu BH (KNO_3) à 150 mg/L de volume final. La méthode par laquelle les HAPS étaient adsorbés sur le silice est expliquée plus loin. Le pyrène était dissout dans l'éther d'extraction à 150 mg/L. Ces essais ont été effectués en duplicata et chaque duplicat a été injecté en duplicata au GC.

4. Enrichissement des microorganismes en bioréacteurs

4.1 Description des bioréacteurs

Pour permettre l'adaptation et l'enrichissement des microorganismes aux hydrocarbures, 5 bioréacteurs ont été fabriqués. Ces bioréacteurs étaient constitués d'une bouteille de 750 mL contenant 400 mL de milieu de base M additionné de 0,5% de protéose peptone et d'extrait de levure auquel on ajoutait 50 mL de sable préalablement nettoyé devant servir de

support pour les hydrocarbures et les bactéries. Le bouchon était en butyle et était traversé d'un tube de borosilicate et d'un autre en acier inoxidable. La conduite de borosilicate était reliée à une série de 2 bouteilles permettant l'évacuation de gaz produit sans risque de reflux (voir figure 1).

Deux réacteurs ont été placés en conditions méthanogéniques (anaérobies strictes) soit les bioréacteurs H1 et H3, et deux autres bioréacteurs ont quant à eux été placés en conditions dénitrifiantes par l'ajout de 2 g/L de KNO_3 au milieu de base M, soit les bioréacteurs H2 et H4. Un cinquième bioréacteur H5, identique à H1, a été démarré pour servir de contrôle abiotique, 200 mg/L de $HgCl_2$ (Anachemia, Montréal) ayant été ajouté pour tuer les microorganismes.

4.2 Nettoyage du sable pour bioréacteurs

Le nettoyage du sable a été effectué en 3 étapes. Premièrement, environ 400 mL de sable (saturé d'eau) fut agité dans un bécher de 2 litres sous un courant d'eau faible mais continu afin d'y soustraire les plus petites particules. Ces dernières étant emportées par l'eau sortant du bécher à cause de leur faible poids. Deuxièment, les composés métaliques présents dans le sable ont été retirés par agitation répétée avec une barre magnétique à laquelle ces composés se fixaient. Troisièmement, une extraction des contaminants du sable a été

Bioréacteurs :

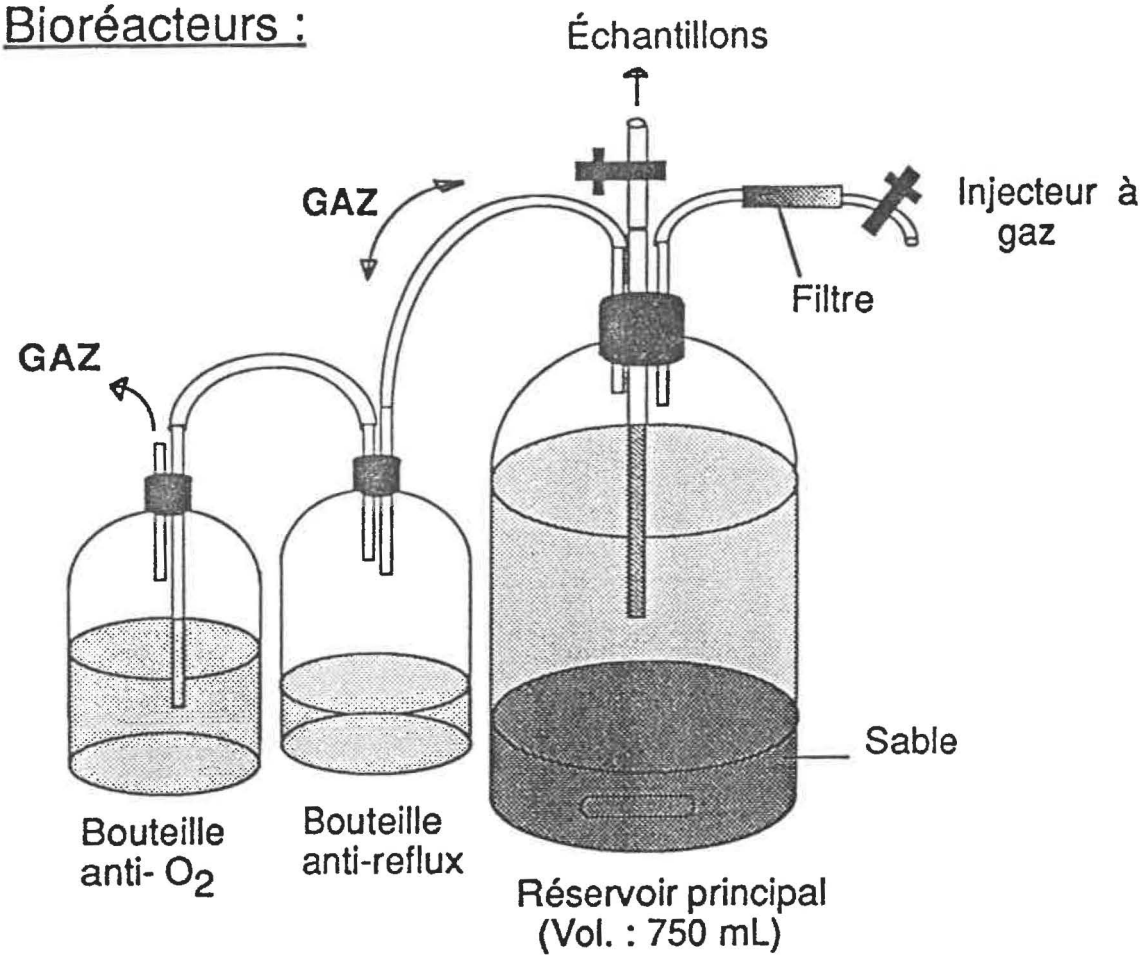

Figure 1. Schéma d'un bioréacteur

effectuée avec du méthanol soit une première extraction avec 400 mL de méthanol 50% suivi d'une deuxième extraction avec 200 mL de méthanol 100%. Le sable a ensuite été récupéré dans 50 mL de méthanol 100% avant l'assècher sous vide dans un dessicateur pendant 1 heure.

4.3 Démarrage et maintenance des bioréacteurs

Chacun des bioréacteurs contenait 500 mL de milieu se composant de 400 mL de milieu de base M additionné de 0,5% de protéose peptone et d'extrait de levure, de 50 ml de boues activées provenant du digesteur anaérobie et aérobie de l'usine d'épuration des eaux de Deux-Montagnes et 15 g de sol contaminé par des hydrocarbures dans le cas des bioréacteurs H1, H2 et H5 et 25 g dans le cas des réacteurs H3 et H4. Au départ, 10 mg/L de chaque HAP a été ajouté au bioréacteur H1, H2 et H5, tandis que les bioréacteurs H3 et H4 n'ont eu comme source d'hydrocarbures que ceux provenant du sol contaminé utilisé comme inoculum. Ce dernier est fortement contaminé par un mélange complexe d'hydrocarbures légers et lourds contenant des HAPs à plusieurs cycles.

À quelques reprises, des boues activées provenant des digesteurs anaérobie et aérobie ainsi que d'autres échantillons de sols contaminés ont été ajoutés aux bioréacteurs. A différents intervalles durant les 200 premiers jours, une

partie du milieu du réacteur a été retirée et remplacée par du milieu frais contenant 1,0 g de glucose par litre. Ensuite seul du milieu minimal remplaçait le milieu retiré. De plus, 10 mg/L puis 50 mg/L de chaque HAP a été ajoutés aux réacteurs H1 et H2 à différents moments. Ces bioréacteurs ont été maintenus en alimentation semi-continue pendant plus de 900 jours. Le pH de la culture a été ajusté au besoin entre 7,0 et 7,4 par additions manuelles de $NaHCO_3$ ou de NaOH.

4.4 Analyse des HAPs dans les bioréacteurs.

Plusieurs essais de dosage de la concentration des HAPs des bioréacteurs ont été effectués sur HPLC en variant les temps d'agitation durant l'extraction, le volume d'échantillon extrait et le type d'instrument utilisé pour les prélèvements (plastique ou verre; seringue ou pipette). Afin de mettre au point une méthode d'analyse, différents dosages ont aussi été effectués à partir d'un bioréacteur modèle de volume inférieur soit d'un volume total de 50 mL de milieu de culture contenant 5 mL de sable nettoyé et 10 mg/L de chaque HAP. Un essai sur l'adsorption des HAPs sur le sable a été effectué en triplicata. On prélevait un échantillon de 2 mL du bioréacteur modèle avant et pendant l'agitation à l'aide une pile magnétique placée dans le bioréacteur. De plus, l'échantillon prélevé avant l'agitation était centrifugé 5 minutes à 14900 g dans une microcentrifugeuse pour s'assurer que les HAPs

extraits seraient essentiellement ceux ayant été solubilisés et non pas adsorbés sur de fines particules en suspension.

5. Tests de biodégradation à partir d'échantillons provenant des bioréacteurs

Pour être en mesure de déterminer si les bactéries des bioréacteurs métabolisaient les HAPs utilisés, différents essais ont été effectués dans des bouteilles à sérum à partir d'un inoculum provenant d'échantillons prélevés dans les bioréacteurs H2 et H4. Lors de ces essais, 100 mg/L d'acénaphtylène, de fluorène et de phénanthrène ont été utilisés comme concentration initiale en HAP. Trois types de cultures ont été étudiées, soit en présence de 100 mg/L de tween 60 ($C_{18}H_{36}O_2$)(J.T. Baker Chemical Co., Phillipsburg), sans tween 60 et avec tween 60 mais dont l'inoculum a été autoclavé (121°C, 15 min.) pour servir de témoins abiotiques.

Ce test a été effectué dans des bouteilles à sérum de 80 mL contenant 70 mL de milieu BH anaérobie, 0,9 mL d'une solution de KNO_3 à 166 g/L pour une concentration finale de 2 g/L, 0,75 mL de tween 60 1% (si nécessaire) et 8 mL d'inoculum préalablement dilué 1:10 dans un tampon phosphate anaérobie. Toutes les bouteilles des essais subséquents ont été conservés à température de la pièce, soit environ 22-24°C et ont été protégés de la lumière. Le dosage a été fait à partir

d'échantillons de 1 mL prélevés dans chaque bouteille aux différents temps. Une concentration de 100 mg/L de tween 60 a été utilisée tel que suggéré par Guérin et Jones (1988) afin d'augmenter la solubilisation des HAPs et d'éviter qu'ils ne s'adsorbent aux parois des bouteilles. De plus, des bouchons de teflon neufs étaient installés après chaque prélèvement afin de prévenir des pertes de HAPs par les trous produits lors des prélèvements.

Un deuxième essai a été fait de façon identique au premier mais cette fois l'inoculum (10%) provenait des bouteilles biotiques contenant du tween 60 de ce premier test après 25 jours d'incubation.

6. Isolement de souches pures

6.1 Essai de mise au point d'un milieu sélectif

6.1.1 Milieux solides contenant des HAPs

Dans un premier temps, un échantillon de chaque bioréacteur a été utilisé comme inoculum pour ensemencer des milieux minimaux BH solides contenant du naphtalène. A chaque bouteille de 80 mL de milieu minimal BH contenant 1% d'agar (Difco), 0,16 mL de naphtalène provenant d'une solution de 50 g/L dans du méthanol a été injecté afin d'obtenir une concentration finale en naphtalène de 100 mg/L. Le naphtalène

a été introduit au milieu après la stérilisation lorsque ce dernier était maintenu à 60°C dans un bain marie avant d'être coulé dans la chambre anaérobie. Les milieux ont été inoculés par étalement de 0,1 mL d'un échantillon provenant des bioréacteurs préalablement dilué 1/10 dans un tampon phosphate (0,1 M) contenant 8,5 g/L de NaCl (PBS).

Dans un deuxième temps, différentes concentrations de HAP ont été utilisées dans nos milieux pour déterminer laquelle de ces concentrations favoriseraient la sélection des microorganismes dégradant les HAPs. Les concentrations utilisées étaient: 0, 100, 300, 500, 1000 et 5000 mg/L. Plusieurs milieux contrôles ont aussi été utilisés, soit: avec de l'agar purifié (Bacteriological N° 1, Oxoid), sans KNO_3 et sans HAP mais avec la même quantité de méthanol utilisée pour solubiliser le HAP.

6.1.2 Test en tube avec goutte d'huile

Pour isoler des souches capables de dégrader des hydrocarbures, des tubes vissés de 12 X 1,5 cm contenant 10 mL de milieu minimal (BH) et ayant comme seule source de carbone 0,2 mL d'huile à chauffage ont été inoculées avec différentes dilutions (10^{-1} à 10^{-4}) d'échantillons des bioréacteurs ou de sols contaminés par des hydrocarbures. Des cultures ont été réalisées avec de l'huile à chauffage qui contenait du

naphtalène à raison de 5 mg par 50 mL d'huile. Du milieu minimal (BH) anaérobie, auquel 2 g/L de KNO_3 a été ajouté, a aussi été utilisé pour chaque échantillon testé. Des tubes inoculés avec la solution de dilution stérile et des tubes ne contenant pas d'huile à chauffage ont servi de contrôles. Chaque culture lors de ces expériences a été faite en triplicata. Les dilutions ont été effectuées dans le tampon phosphate (PBS) aérobie ou anaérobie. La croissance bactérienne était observée par l'apparition de turbidité à l'interface huile-milieu. Après 7 jours à 23°C, les cultures provenant de la plus forte dilution ayant démontré une croissance étaient sélectionnées. Ces cultures étaient alors diluées 1/10 et un volume de 0,1 mL était étalé sur un milieu minimal BH contenant 1% d'agar sur lequel 0,1 ml d'huile avait été étendu à l'aide d'une tige de verre. Les microorganismes dominants de ces cultures ont été isolés en culture pure par repiquage sur des pétris de BHYT (KNO_3) contenant 1% d'agar.

7. Caractérisation des souches isolées

7.1 Transformation des HAPs sur milieu solide

Pour déterminer si les souches isolées avaient une activité envers un des HAPs utilisés, les différentes souches ont été repiquées sur milieu solide BHYT (KNO_3) vaporisé avec une solution d'acétone contenant 2% d'un HAP selon la méthode

décrite par Kiohara *et al.* (1982). Le milieu BHYT contenait 3,25 g/L de BH, 2% de bacto-tryptone et 1% d'extrait de levure. Chaque HAP a donc été vaporisé sur différents pétris de façon à former un mince film de HAP à la surface de l'agar après l'évaporation rapide du solvant. Après incubation à la noirceur à température de la pièce, pendant une période variant de 1 à 14 jours, les souches, qui ont montré une zone claire autour de la colonie, ont été considérées potentiellement actives envers le HAP utilisé. Ces essais ont été réalisés en conditions aérobies ou anaérobies. Dans ce dernier cas, les milieux ont été préparés et les cultures ont été incubées dans une chambre anaérobie en présence d'un gaz composé de 10% de CO_2, 10% de H_2 et de 80 de N_2.

7.2 Conservation des souches

Les souches isolées ont été conservées à -80°C dans du milieu BHI (Brain Heart Infusion, Gibco Labo., Madison, USA) contenant 10% de glycérol. Pour ce faire, une solution de 50 mL contenant 1,9 g de BHI et 5 mL de glycérol a été répartie à raison de 5 mL dans 10 tubes avec bouchon vissé qui ont été par la suite stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C. Pour congeler une souche, le contenu d'un tube était versé dans un pétri contenant une culture de 16 heures de la souche désirée. À l'aide d'une tige de verre courbée, les bactéries étaient suspendues de façon à ce que l'on puisse les recueillir

et les redistribuer dans des tubes capés à raison de 0,5 mL par tube. Ces derniers étaient alors rapidement congelés dans un volume d'éthylène glycol contenant de la glace sèche avant d'être placés au congélateur à -80°C. Lors de la décongélation, le tube était placé dans un bécher d'eau tiède. Puis 0,1 mL du milieu BHI glycérol 10% contenant la souche était étalée stérilement sur un pétri de BHYT (KNO_3), puis incubée à 29°C pendant 16 à 24 heures. Les manipulations nécessitant un environnement stérile étaient réalisées dans une hotte à flux laminaire.

7.3 Caractérisation biochimique et identification

Après une croissance de 24 à 48 hres sur milieu solide BHYT, les souches isolées ont été observées au microscope optique (Leitz, modèle Laborlux D) pour déterminer leur morphologie après une coloration Gram. La galerie API 20E (API Laboratory Products Ltd., Ville St-Laurent) a aussi été utilisée pour connaître leur profil biochimique et tenter de les identifier. Elles ont donc toutes été repiquées sur un milieu MacConkey (Quélab, Montréal, 1577), ce qui a permis de confirmer le résultat de leur Gram ainsi que de savoir si elles pouvaient utiliser le lactose. Deux ou trois colonies étaient alors récupérées dans un tube contenant 5 mL d'eau salée stérile. Après agitation, la culture était distribuée stérilement dans les différents tubes de la galerie API 20E

selon la procédure recommendée. Les galeries étaient ensuite incubées dans un sac en plastique à 29°C de 24 à 48 heures avant que l'on effectue la lecture. Une souche a été repiquée sur milieu sélectif pour *Pseudomonas* (Quélab, PI 1421) et a été soumise à un test à la chaleur pour évaluer si elle formait des spores. La culture a ainsi été chauffée 10 min. à 80°C avant d'être repiquée sur un milieu Maconkey et TSA SMD/SBD (Quélab, 1993) et incubée 16 heures à 29 °C pour vérifier s'il y avait croissance donc sporulation. De plus, une modification des tests d'oxidation-fermentation (OF-F et OF-O) a été effectuées pour préciser l'identification par galerie API 20E. La souche ayant poussé sur le milieu PI a été repiquée dans 2 tubes de gélose semi-solide de dextrose (Quélab) puis de l'huile a été ajouté à un des tubes de façon à bloquer l'entrée d'oxygène et ainsi permettre de verifier si la souche peut fermenter le dextrose. Un test de réduction des nitrates en condition anaérobie a aussi été fait sur plusieurs souches isolées. Après incubation de 24 hres dans un tube de nitrate (Quélab, 2056), 2 gouttes d'acide sulfanilique 0,8% et 2 gouttes de N, N, N'diméthyl-alpha-naphthylamine 0,5% ont été ajoutées pour révéler la présence de nitrite, l'acide sulfanilique rendant les nitrites rouges. Si la coloration ne changeait pas, de la poudre de zinc était ajoutée, ce qui permettait de vérifier si la négativité de la réaction ne provenait du fait que tous les nitrates aient été réduits en azote (N_2). En effet le zinc agit

comme catalyseur inorganique sur les nitrates.

8. Tests de biodégradation de HAPs à partir des souches pures en milieu liquide

8.1 Détermination des courbes de croissance

Après avoir décongelé un tube de la souche étudiée, un volume de 0,1 mL était inoculé sur un pétri de BHYT (KNO_3) et incubé à 29°C. Après une incubation de 16 à 24 heures, les bactéries ayant poussé sur la gélose ont été recueillies avec 5 ml de PBS. Pour le test de croissance en conditions anaérobies, 2 mL du PBS contenant les bactéries prélevées dans la chambre anaérobie ont été ensuite injectées dans une bouteille à sérum contenant 70 mL de milieu frais BHYT (KNO_3) anaérobie. Pour le test en conditions aérobies, le volume d'inoculum nécessaire pour l'obtention d'une densité optique finale de 0,15 a été calculé selon la densité optique (D.O.) de la culture recueillie dans 5 mL de PBS. Ce volume a ensuite été inoculé dans un erlenmyer de 500 mL contenant 100 mL de BHYT (KNO_3). L'incubation en conditions aérobies s'est effectuée dans un incubateur rotatif (New Brunswick Scientific, Edison, E.U.) à 29°C et 210 rpm. À différents intervalles de temps, la densité optique des différentes cultures a été déterminée avec un spectrophotomètre (Canlab, modèle SP6-550) à 540 nm.

8.2 Essais de biodégradation des HAPs sur sable de silice

8.2.1 Mise au point de la méthode

Dans le but d'augmenter la surface de contact des HAPs trop peu solubles dans les milieux utilisés, une quantité connue de HAPs dissout dans de l'éther a été mélangée à du sable de silice (SiO_2)(Fisher, S-150). L'éther a ensuite été évaporé à l'aide d'un rotavapeur (Büshi, Suisse) et les HAPs sont demeurés fixés sur le sable de silice. Le silice a été réparti en quantité égale dans les bouteilles utilisées pour les tests et le milieu de culture a ensuite été ajouté. Des expériences ont été faits en utilisant 2, 3 ou 5 grammes de SiO_2 et 2 ou 3 mL de milieu frais contenant l'inoculum par bouteille. L'écart-type résultant du dosage de plusieurs bouteilles au silice avant et après stérilisation (121 °C, 15 min) a été calculé pour déterminer la variation de concentration en HAP inhérente à cette méthode et à l'autoclavage des HAPs dans ces conditions. Pour chaque échantillon, on effectuait l'extraction complète d'une bouteille. Le dosage était effectué par chromatographie en phase gazeuse tel que décrit à la section 3.2.1.

8.2.2 Essais de biodégradation

Des tests de biodégradation en milieu liquide des HAPs adsorbés sur silice ont été effectués pour chaque souche ayant

démontrée une activité, selon le test de transformation de HAP sur milieu solide en conditions anaérobies, avec le HAP correspondant. Ces essais ont été réalisés dans des bouteilles à sérum de 10 mL contenant 3 grammes de silice, 0,6 mg de HAP et 2 mL de milieu $BH(YT)_{1/10}$ KNO_3 frais contenant l'inoculum bactérien. Le milieu $BH(YT)_{1/10}$ KNO_3 était composé des mêmes ingrédients que le milieu enrichi BHYT (KNO_3) mais n'avait que 10% de la concentration en bacto-tryptone et en extrait de levure, soit 0,1% et 0,05% respectivement.

D'autres tests ont été effectués avec la souche G_6 en utilisant les 4 HAPs simultanément et différentes conditions de culture ont été évaluées. Les milieux de culture utilisés ont été :

- BHYT (KNO_3) anaérobie
- $BH(YT)_{1/10}$ (KNO_3) anaérobie
- $BH(YT)_{1/10}$ (KNO_3) aérobie
- $BH(YT)_{1/10}$ (KNO_3) anaérobie + tween 20 (0,02%)
- $BH(YT)_{1/10}$ (KNO_3) anaérobie + Inipol (0,2%)
- $BH(YT)_{1/10}$ (KNO_3) aérobie + Inipol (0,2%)

Le tween 20 provient de la compagnie Genzyme d'Angleterre, tandis que l'Inipol EAP 22 a été gracieusement offert au laboratoire de Gilles Paquette par la compagnie Elf Aquitaine, Paris. Les essais aérobies ont été faits dans des bouteilles de 60 mL de volume afin d'assurer une certaine quantité d'oxygène malgré que ces bouteilles soient fermées hermétiquement pour

limiter l'évaporation des HAPs. Toutes les bouteilles de ces tests étaient agitées périodiquement.

L'inoculum bactérien était obtenue d'une culture de la souche testée prélevée au 2/3 de la phase logarithmique de croissance d'une culture aérobie de 100 mL dans du milieu BHYT(KNO_3) dans un erlenmeyer de 500 mL selon les conditions utilisées pour la détermination des courbes de croissance.

Une fois dans la chambre anaérobie, l'inoculum était ajouté à 200 mL de milieu anaérobie de manière à obtenir une densité optique de 0,150 à 540 nm. Le milieu était ensuite réparti à l'aide d'une seringue répétitive en verre (Becton, Dickinson et Co., E.U.) dans les bouteilles biotiques devant servir pour déterminer la cinétique de biodégradation. Des contrôles abiotiques ont été effectués avec la culture bactérienne inactivée par autoclavage (121°C, 15 min.) avant d'être réparti dans les bouteilles. Pour les tests aérobies, ces manipulations se faisaient dans une hotte à flux laminaire.

Le pH du milieu ainsi que le compte bactérien ont été déterminés pour chaque test. L'énumération bactérienne a été effectuée par dilution décimale en série de l'échantillon dans un tampon phosphate (PBS) et étalement de 0,1 mL de chaque dilution en triplicata sur des milieux solides BHYT (KNO_3) aérobies. Les pétris ont été incubés en conditions aérobies

pendant 24 heures à 29°C. Les dosages des HAPs ont été effectués en triplicata à l'exception de certains tests qui furent prolongés dans le temps. Une vérification de l'activité des souches face au HAP sur milieu solide a été effectué à partir des colonies obtenues des énumérations bactériennes selon le protocole de la section 7.1.

8.3 Essais de biodégradation des HAPs en milieu aqueux

8.3.1 Essai de biodégradation de l'acénaphtylène avec la souche G6

La préparation de l'inoculum a été fait dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour les tests avec les HAPs adsorbés sur silice (section 8.2.2), à l'exception que les milieux de culture utilisés solides ou liquides contenaient 200 mg/L d'acénaphtylène de façon à favoriser une pression sélective lors de la croissance de la souche. Quatre tests (A1 à A4) ont été effectués avec 4 mL de milieu BH anaérobie frais contenant du KNO_3, la solution de minéraux et de vitamines aux concentrations déjà décrites, ceci dans une bouteille de 8 mL. L'inoculum a été ajouté au milieu frais avant la distribution dans les bouteilles tandis que 0,1 mL d'acénaphtylène d'une solution contenant 1,23 g/L dissout dans du méthanol a été ajouté à chaque bouteille. L'acénaphtylène a été ajouté aux bouteilles abiotiques après stérilisation par autoclavage à

121°C pendant 15 minutes.

Dans les tests A1 et A3, seulement 0,5 g/L de bacto-tryptone et 0,5 g/L d'extrait de levure ont été ajoutés au milieu tandis que 5 g/L de ces deux produits a été ajouté au milieu lors des tests A2 et A4. Du tween 20 (0,02%) a également été ajouté au milieu des tests A3 et A4.

9. Test de production de biosurfactants par les souches purifiées

La production de biosurfactants par les souches sélectionnées a été mesurée selon une modification de la méthode utilisée par Jain (1992) et par le *drop-collapsing test* (Jain, 1991) mesurant la diminution de la tension de surface. Un échantillon de 10 mL d'une culture de 7 jours dans le milieu BH contenant 20 g/L de glucose incubé en conditions aérobies avec agitation à 150 rpm et à 26°C. La culture a été centrifugée à 10000 g pendant 15 minutes. La tension de surface du surnageant a ensuite été mesurée à l'aide d'un tensiomètre de surface (Fisher). Le *drop-collapsing test* consiste à mesurer l'étalement d'une goutte de culture (100 µL) déposée sur une surface recouverte d'huile. Le maintien de la forme arrondie de la goutte de culture suggère qu'il n'y a pas ou peu de production de biosurfactant alors que l'étalement ou la dispersion de la goutte suggère qu'il y a production de

biosurfactant. Du milieu non-inoculé a servi de contrôle négatif tandis que le milieu inoculé avec la souche UG2 a servi de contrôle positif. La souche UG2, qui est reconnue pour son activité émulsifiante (Berg *et al.*, 1990), nous a été gracieusement offerte par Hung Lee et Jack T. Trevors de l'université Guelph (Ontario).

RÉSULTATS

1. Mise au point d'une méthode d'analyse des HAPs par HPLC

Une méthode de séparation des quatre HAPs à l'étude a été mise au point par HPLC en utilisant une colonne hydrophobe radial pak C_{18}. L'utilisation de la phase mobile acétonitrile:eau selon le ratio 60:40 (v:v), a donné un léger chevauchement entre le naphtalène et l'acénaphtylène et entre le fluorène et le phénanthrène. La phase mobile 40:60 (v:v) ne permettait pas d'éluer les HAPs de la colonne. L'utilisation d'une phase mobile 50:50 (v:v) a permis une séparation complète des HAPs avec des temps de rétention (min.) de 13,36 pour le naphtalène, 16,47 pour l'acénaphtylène, 22,68 pour le fluorène et 26,40 pour le phénanthrène. Des courbes d'étalonnage ont été effectuées à 254 nm pour les quatre HAPs à des concentrations variant de 0 à 150 mg/L. La longueur d'onde d'absorbtion maximale (λ_{max}) au spectrophotomètre a été déterminée pour chaque HAP et les valeurs obtenues sont 275 nm pour le naphtalène, moins de 235 nm pour l'acénaphtylène, 260 nm pour le fluorène et 250 nm pour le phénanthrène (Figure 2). De nouvelles courbes d'étalonnage de 0 à 150 mg/L ont été faites au λ_{max} du naphtalène et l'acénaphtylène. Les coefficients de corrélation (R^2) ont varié de 0,986 à 0,999 tout au long des différentes analyses des régressions linéaires effectuées.

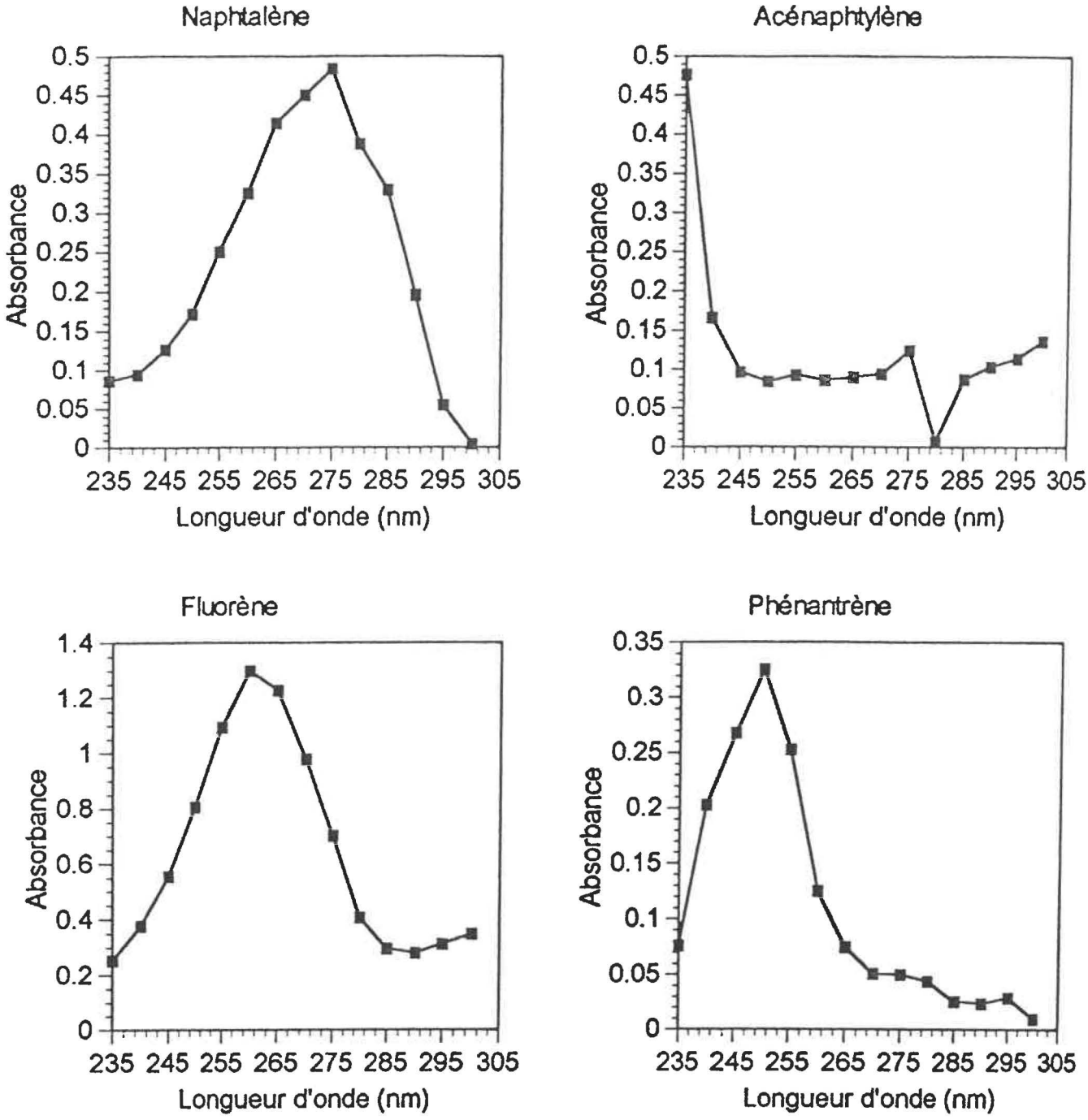

Figure 2. Spectres d'absorbance au spectrophotomètre déterminés entre 235 et 300 nm pour des solutions de 1 g/L de naphtalène, d'acénaphtylène, de fluorène et de phénantrène dissous dans l'éthanol.

2. Adaptation et enrichissement des microorganismes à dégrader des HAPs dans des bioréacteurs anaérobies

Ces réacteurs ont servi à adapter et à enrichir la flore microbienne présente dans les sols pollués ou les boues activées provenant d'une usine d'épuration des eaux usées. Les analyses provenant des échantillons prélevés de ces réacteurs ne nous permettaient pas de suivre quantitativement la dégradation des HAPs étant donné que ces derniers étaient en partie précipités dans le milieu ou encore adsorbés sur les parois du réacteur et sur le sable. La forme sous laquelle se retrouve les HAPs dans les bioréacteurs, solubilisés ou autre (adsorbés ou précipités), a été mesurée dans un bioréacteur modèle (figure 3). On peut voir que 40% du naphtalène et de l'acénaphtylène se retrouve solubilisé comparativement à 4,5% et 2,2% respectivement pour le fluorène et le phénanthrène. Les bioréacteurs ont donc été utilisés comme source de microorganismes lors d'essais subséquents pour évaluer la capacité de dégradation des HAPs dans des essais en bouteilles de sérum ou pour l'isolement de microorganismes actifs face aux HAPs.

2.1 Evaluation de la capacité de dégradation des HAPs

La capacité de dégradation des HAPs par les microorganismes provenant des bioréacteurs H2 et H4 a été évaluée dans des essais réalisés dans des bouteilles à sérum.

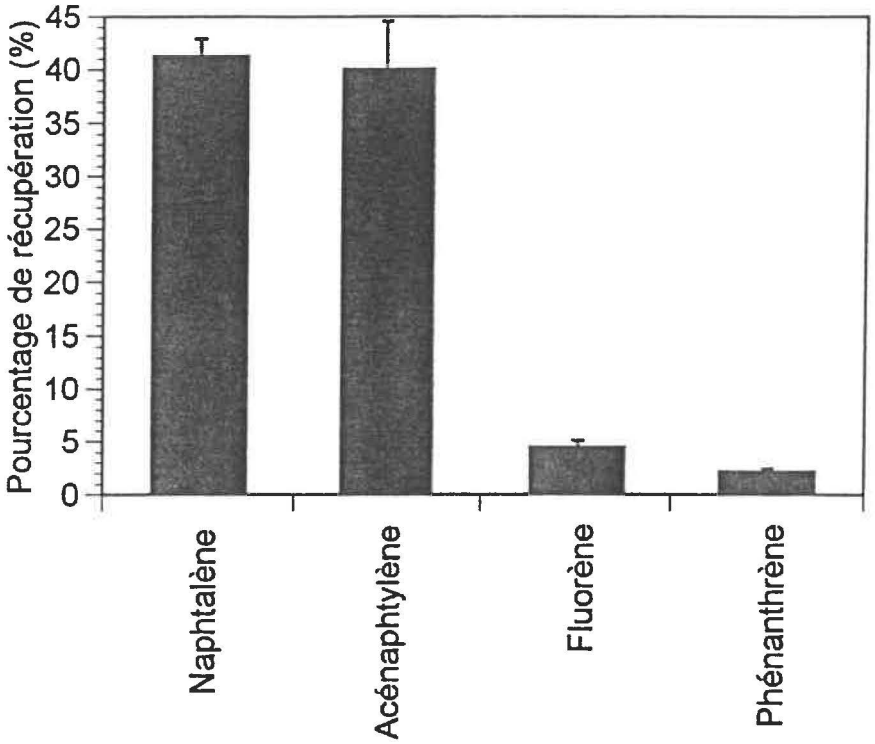

Figure 3. Pourcentage de naphtalène, de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène solubilisé dans le bioréacteur modèle contenant 10 mg/L de chque HAP. L'extraction a été effectué avec de l'acétonitrile (33%).

L'effet de la présence ou de l'absence du surfactant tween 60 sur la biodégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène a été étudié (figure 4 à 7). Au quatorzième jour d'incubation des bouteilles contenant des cultures obtenues à partir d'échantillons provenant du bioréacteur H2 (figure 4), on observe une diminution de la concentration, avec et sans tween respectivement, de 53 et 29% pour l'acénaphtylène, 73 et 52% pour le fluorène et 71 et 52% pour le phénanthrène. À ce moment, la disparition observée dans les témoins abiotiques pour les trois HAPs est négligeable soit: 4, 4 et 3%. Par la suite, la concentration demeure constante dans les bouteilles biotiques alors qu'on observe une diminution des HAPs récupérés dans les témoins abiotiques soit près de 20%.

Dans les bouteilles préparées à partir d'échantillons provenant du réacteur H4, on observe que la disparition au quatorzième jour, avec et sans tween, a été plus faible par rapport au réacteur H2 soit 34 et 15% pour l'acénaphtylène, 50 et 28% pour le fluorène et 49 et 28% pour le phénanthrène (figure 5). A ce moment, la diminution observée dans les témoins abiotiques pour les trois HAPs est cependant négligeable soit: 0, 6 et 2%. Par contre, cette diminution a continué après le quatorzième jour autant dans les bouteilles biotiques que dans les témoins abiotiques, soit près de 20% de plus après 24 jours.

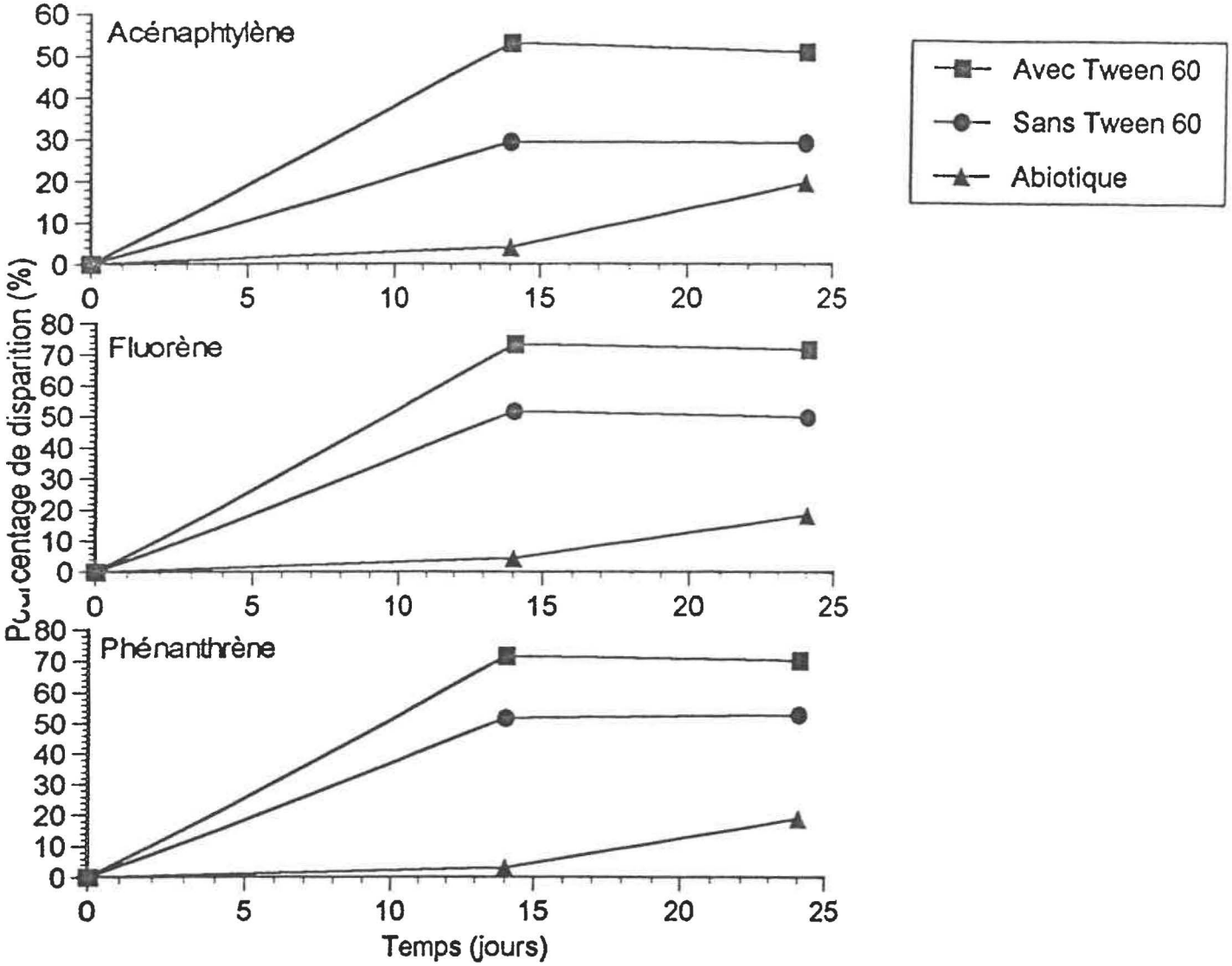

Figure 4. Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie par les bactéries provenant du bioréacteur H2 en présence ou en l'absence de tween 60. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C.

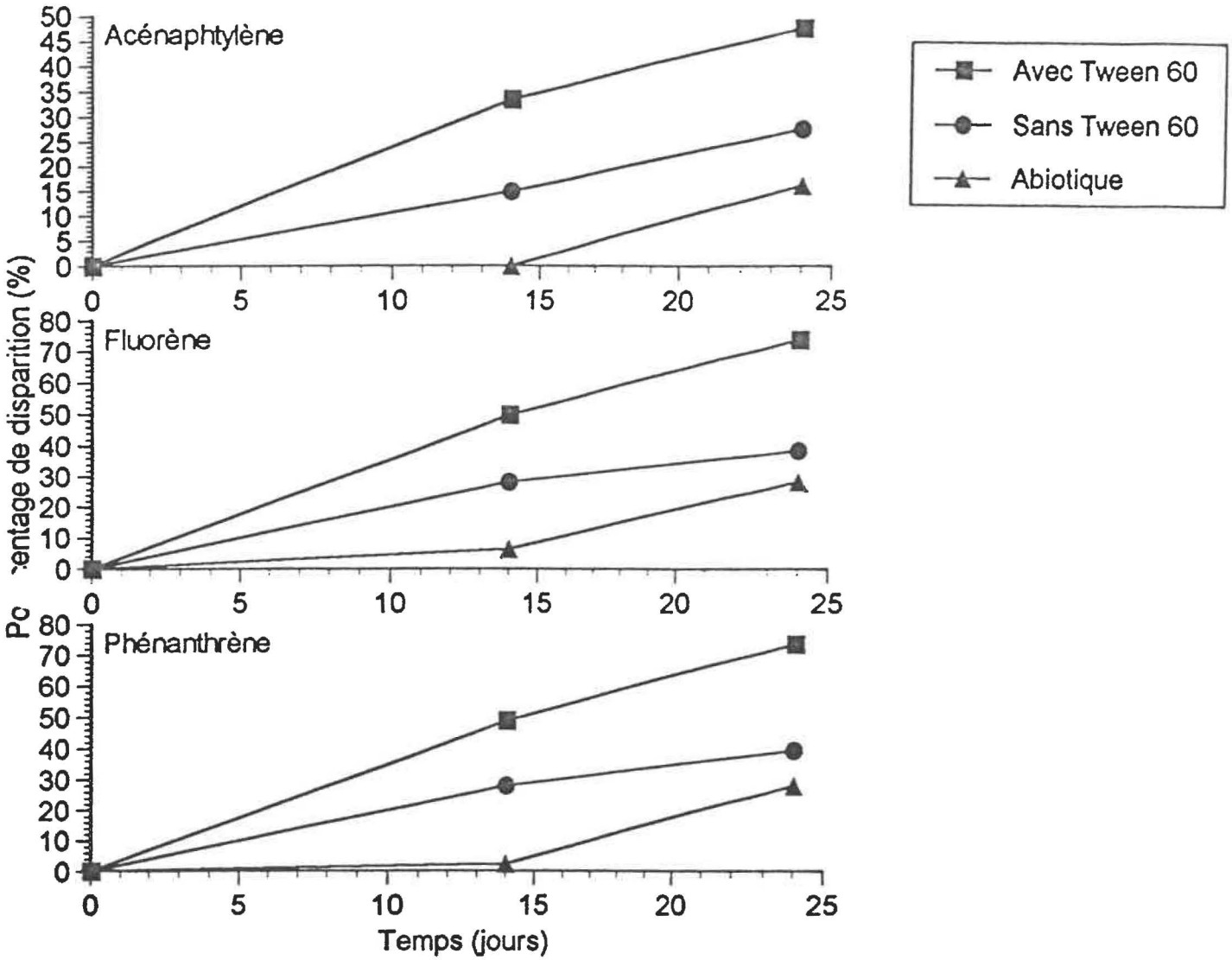

Figure 5. Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie par les bactéries provenant du bioréacteur H4 en présence et en absence de tween 60. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C.

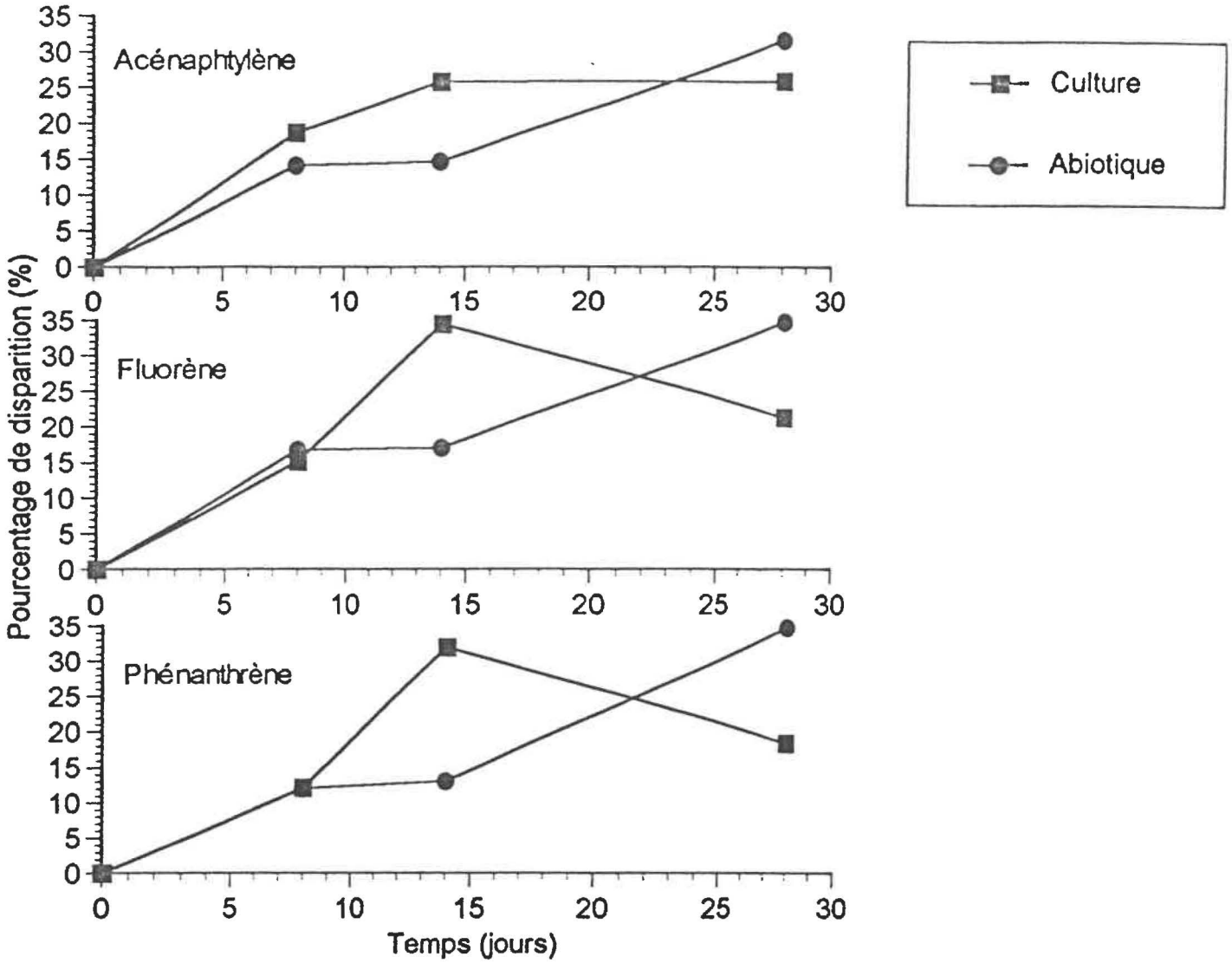

Figure 6. Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie contenant 0,01 % de tween 60 inoculé avec les bactéries provenant du test précédent avec le bioréacteur H2 après 25 jours d'incubation. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C.

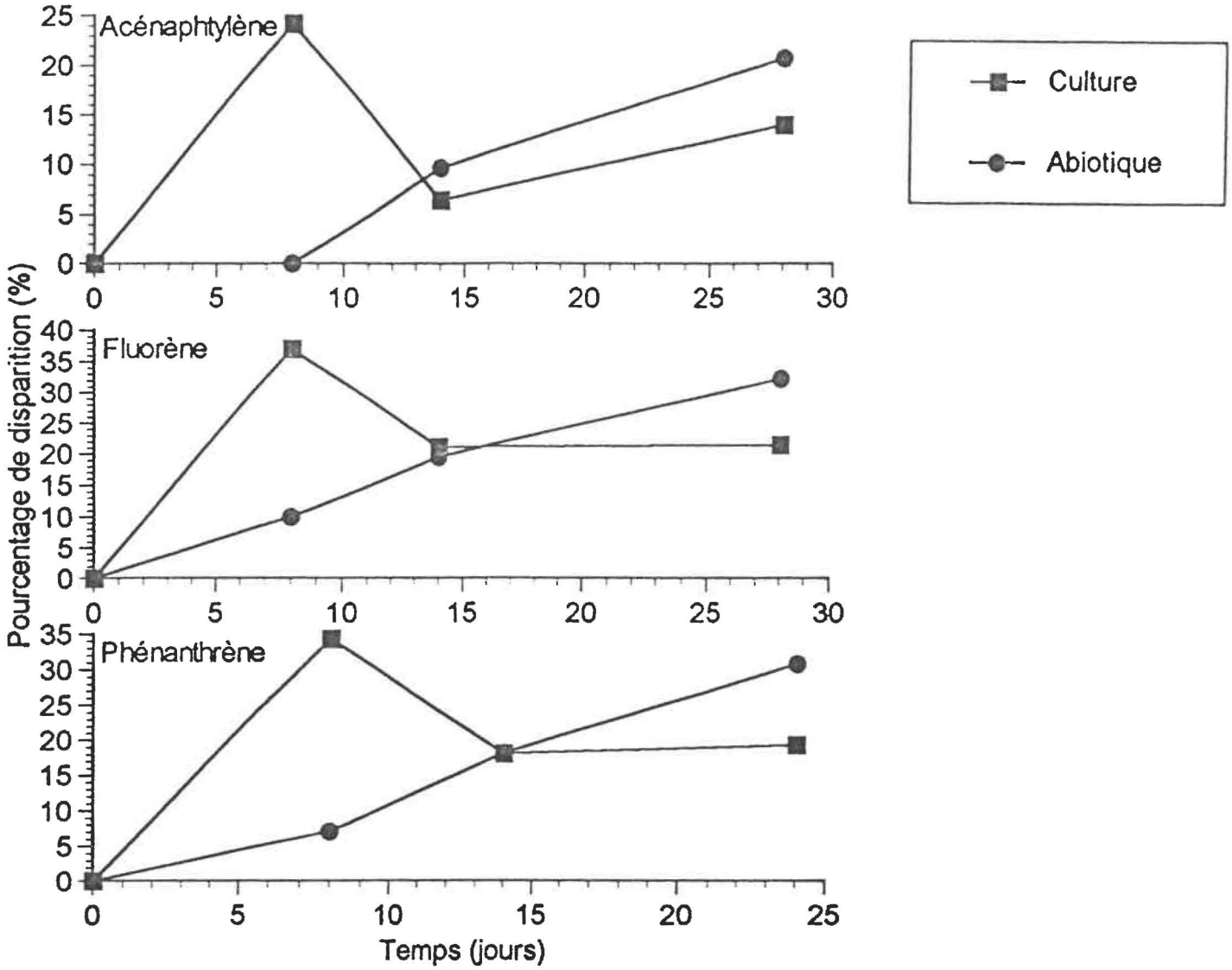

Figure 7. Essais de dégradation de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène en conditions dénitrifiantes (2 g/L de KNO_3) dans le milieu BH anaérobie contenant 0,01 % de tween 60 inoculé avec les bactéries provenant du test précédent avec le bioréacteur H4 après 25 jours d'incubation. Le contrôle abiotique a été autoclavé 15 minutes à 121°C.

Une deuxième série d'expériences utilisant un inoculum provenant des bouteilles biotiques du premier essai contenant le tween 60 a été réalisée afin d'enrichir les microorganismes et d'évaluer leur activité. Les figures 6 et 7 présentent les résultats de ce deuxième essai. Le pourcentage de disparition des trois HAPs était plus élevé dans les bouteilles biotiques provenant de H2 et H4 après 14 et 8 jours respectivement mais par la suite ce pourcentage diminue et celui des témoins abiotiques augmente plus rapidement. Aucune variation significative du pH n'a été enregistrée durant l'incubation. Il est à noter que de fortes variations observées lors du dosage de la concentration en HAPs des bouteilles sans tween 60, dans certains cas plus de 50%, ont amené l'abandon du suivi de ces bouteilles.

3. Mise au point d'une méthode d'extraction et d'analyse des HAPs par chromatographie en phase gazeuse

Afin d'améliorer nos possibilités d'analyses des HAPs, une méthode a été mise au point permettant d'obtenir une séparation adéquate par chromatographie en phase gazeuse des quatre HAPs à l'étude.

Lors des premiers essais d'extraction des HAPs, où le naphtalène était utilisé comme standard interne, nous avons observé qu'après une seule extraction à l'éther les taux de

récupération étaient faibles (inférieures à 50%) et qu'ils étaient encore plus faibles (moins de 30%) après une deuxième extraction (figure 8), ceci lorsque le pH du milieu était de 7.1 et qu'une évaporation à l'azote était effectuée avant la resuspension dans l'acétonitrile et addition du standard interne.

L'addition de NaCl (saturation) au milieu n'a pas amélioré les taux de récupération du fluorène et du phénanthrène, une diminution de 25 et 20% respectivement a été obtenue par rapport au contrôle (figure 9). L'acénaphtylène a par contre été légèrement favorisé dans ces conditions car son taux de récupération a augmenté de 25% par rapport au contrôle. Il faut noter la forte variation entre les échantillons du duplicata contrôle soit près de 22% de la valeur obtenue. L'effet d'un pH basique (pH = 10.66) du milieu sur cette méthode d'extraction a aussi été déterminé et donne des résultats encore plus faibles. Il diminue significativement le pourcentage d'extraction des trois HAPs, soit de 74% pour l'acénaphtylène, 64% pour le fluorène et 44% pour le phénanthrène.

L'effet de l'évaporation sous jet d'azote sur le pourcentage de récupération des HAPs lors d'une extraction effectuée en conditions standards suivi de la resuspension dans un même volume d'acétonitrile a été étudié (figure 10). L'extraction sans évaporation sous jet d'azote augmente

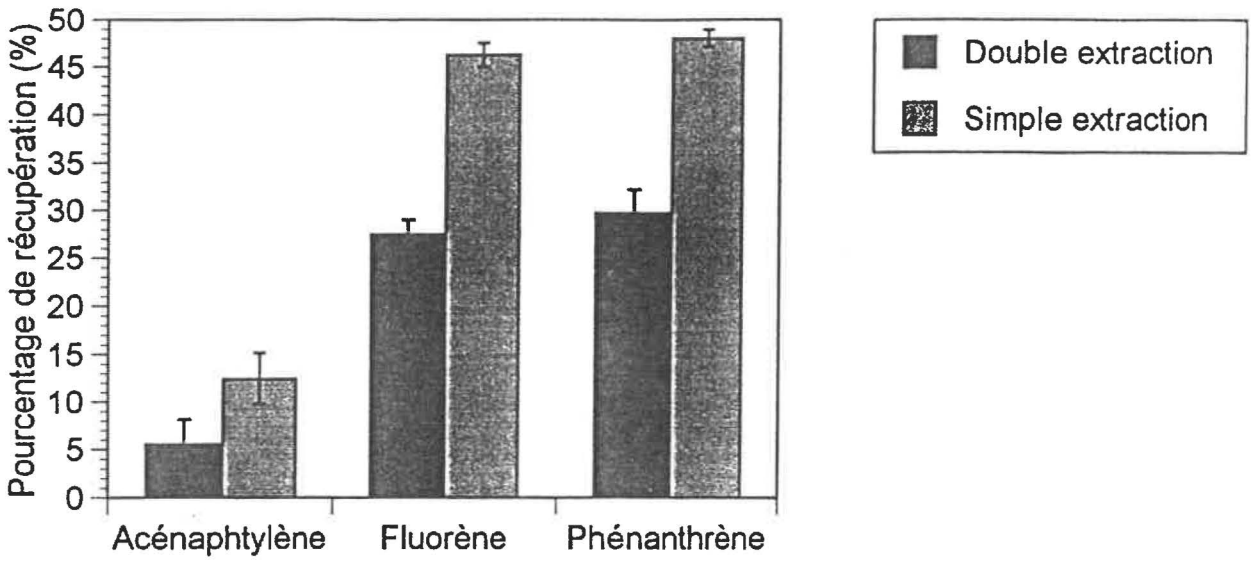

Figure 8. Effet du nombre d'extractions sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène effectués à partir d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther suivi d'une évaporation sous jet d'azote et d'une resuspension dans un même volume d'acétonitrile auquel est ajouté le standard interne.

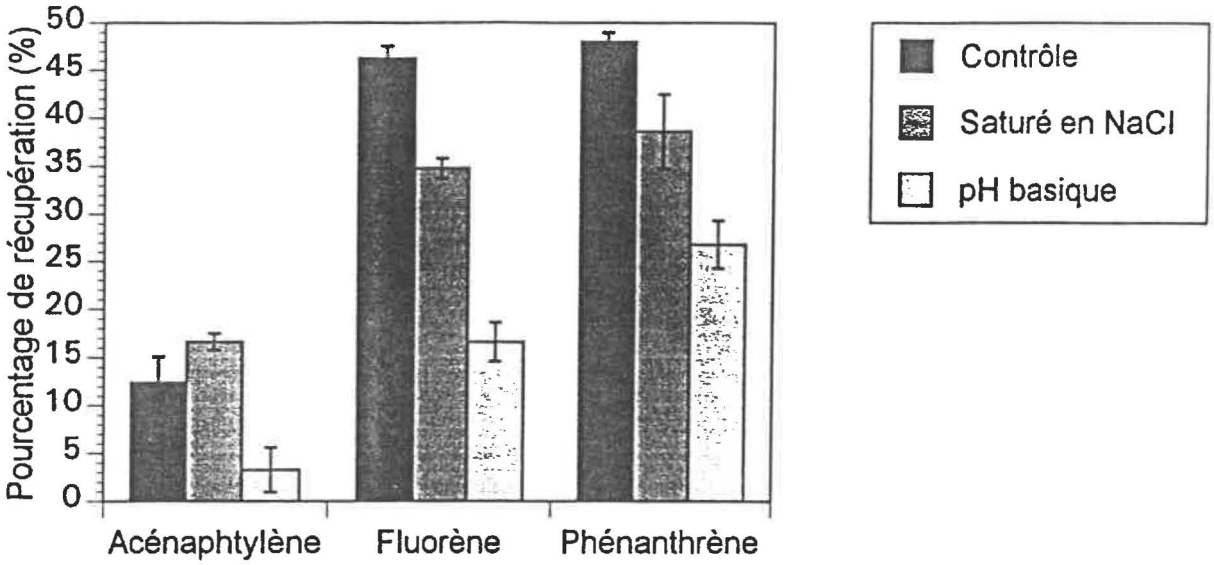

Figure 9. Effet de la saturation en NaCl et du pH basique du milieu sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène obtenu à partir de l'extraction d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther suivi d'une évaporation sous jet d'azote et d'une resuspension dans un même volume d'acétonitrile auquel est ajouté le standard interne.

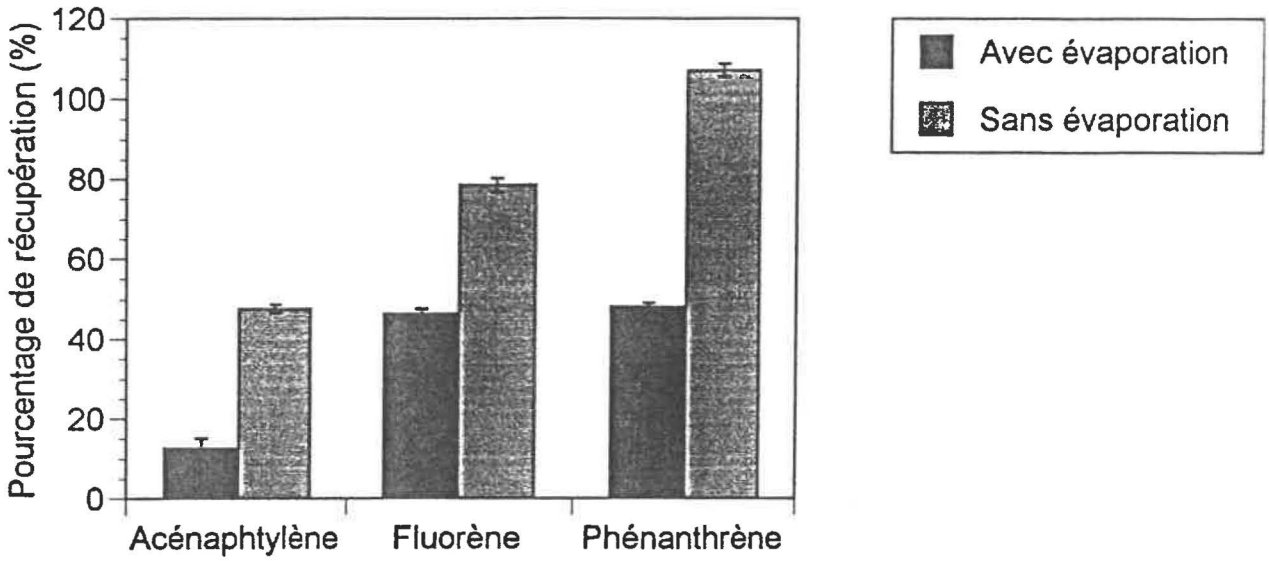

Figure 10. Effet de l'évaporation à l'azote sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène obtenu à partir de l'extraction d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther. Le standard interne a été ajouté après l'extraction.

fortement la récupération des HAPs soit de 74, 41 et 55% respectivement.

À la figure 11, l'introduction du standard interne avant une extraction dans ces mêmes conditions (*i.e.* sans évaporation sous jet d'azote) amène une nouvelle augmentation du pourcentage de récupération des HAPs. Il faut tout de même noter que ces nouveaux pourcentages dépassent largement, pour le fluorène et le phénanthrène, 100% de récupération. Par conséquent, ils ne peuvent provenir que d'une diminution de l'aire sous la courbe obtenue pour le standard interne qui amène une surestimation du ratio (aire sous la courbe du HAP/aire sous la courbe du standard interne) utilisé pour le calcul de la concentration en HAP extraite. La méthode d'extraction choisie a donc été celle utilisée à la figure 10 sans évaporation sous jet d'azote avec ajout du standard interne après l'extraction.

Le pyrène a été choisi comme standard interne pour les essais ultérieurs car c'est un HAP possédant quatre cycles aromatiques. Il est donc beaucoup moins volatil et n'interfère pas avec les HAPs étudiés puisqu'il sort à la fin du chromatogramme avec le gradient de température utilisé. Les résultats concernant la mise au point de la méthode d'extraction des HAPS sur sable de silice en utilisant le pyrène comme standard interne seront présentés à la section 5.1.1.

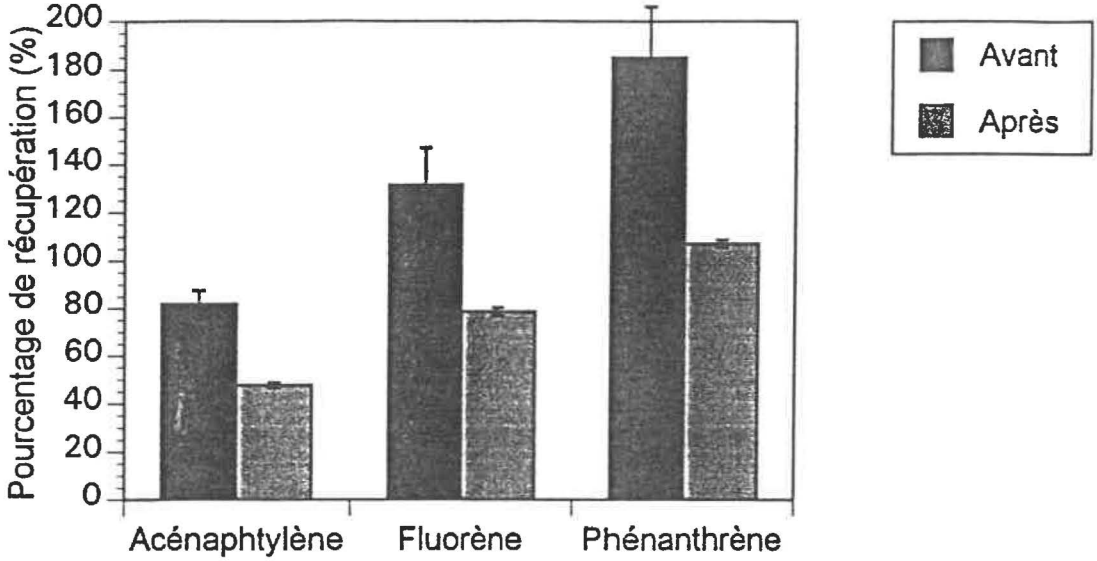

Figure 11. Effet de l'ajout du standard interne avant ou après l'extraction sur le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène obtenu à partir d'échantillons de milieu BHYT (KNO_3) contenant 100 mg/L de tween 60 et de chaque HAP avec un volume égal d'éther sans évaporation sous jet d'azote.

4. Isolement de souches pures dégradant potentiellement les HAPs

4.1 Essais sur milieux solides avec un HAP comme source de carbone

L'utilisation de HAP comme seule source de carbone incorporé dans des milieux solides s'est avérée très limitée comme méthode d'isolement. Aux concentrations utilisées (0 à 5 g/L) aucune différence de croissance n'a été observée entre les milieux contenant des HAPs et les milieux contrôles.

4.2 Isolement après enrichissement sur goutte d'huile

Les essais réalisés dans des tubes contenant le milieu minimal BH (KNO_3) et une goutte d'huile à la surface comme unique source de carbone ont permis l'isolement de plusieurs souches. Dans un premier temps, quatre souches ont ainsi été isolées à partir d'échantillons provenant des bioréacteurs et trois autres ont été isolées à partir d'échantillons de sols contaminés. Ces souches ont été identifiées I_1 à I_7. Sur ces sept souches, 4 ont été isolées dans les tubes dont la goutte d'huile contenait 100 mg/L de naphtalène de plus. Par la suite, 8 souches ont été isolées à partir de différents échantillons de sols contaminés provenant d'industries pétrolières et 4 souches ont été isolées par cette méthode à partir d'échantillons de réacteurs aérobies à l'étude dans les labora-

toires de l'Institut. Ces souches ont été identifiées G_1 à G_{12}.

4.3 Test de transformation des HAPs sur milieux solides

Les différentes souches isolées par le test en tube avec goutte d'huile ont toutes été testées envers les quatre HAPs au test de vaporisation de HAP sur milieux solides. Certaines souches produisaient une zone claire autour des colonies (figure 12), ce qui suggerait une activité de transformation ou de dégradation envers le HAP testé. Les résultats des tests effectués en conditions aérobies sont présentés au tableau 1. On observe que 12 souches ont donné un résultat positif, 4 souches ont montré un plus grand potentiel par la transformation de trois HAPs, tandis que 4 souches ne transformaient qu'un seul HAP. La volatilisation plus rapide du naphtalène et de l'acénaphtylène rendait plus difficile l'observation de ces zones d'hydrolyse à cause du temps nécessaire pour la croissance bactérienne et la formation d'une zone claire. Les résultats des tests effectués en conditions anaérobies sont présentés au tableau 2. Seulement 7 des 19 souches isolées au départ ont donné un résultat positif en conditions anaérobies. Seule la souche G_{11} a démontré un potentiel envers plus d'un HAP, soit l'acénaphtylène et le phénanthrène. Aucune souche n'a démontré une activité envers le fluorène. Dans le cas du naphtalène, la volatilisation rapide de ce substrat n'a pas permis d'évaluer le potentiel des

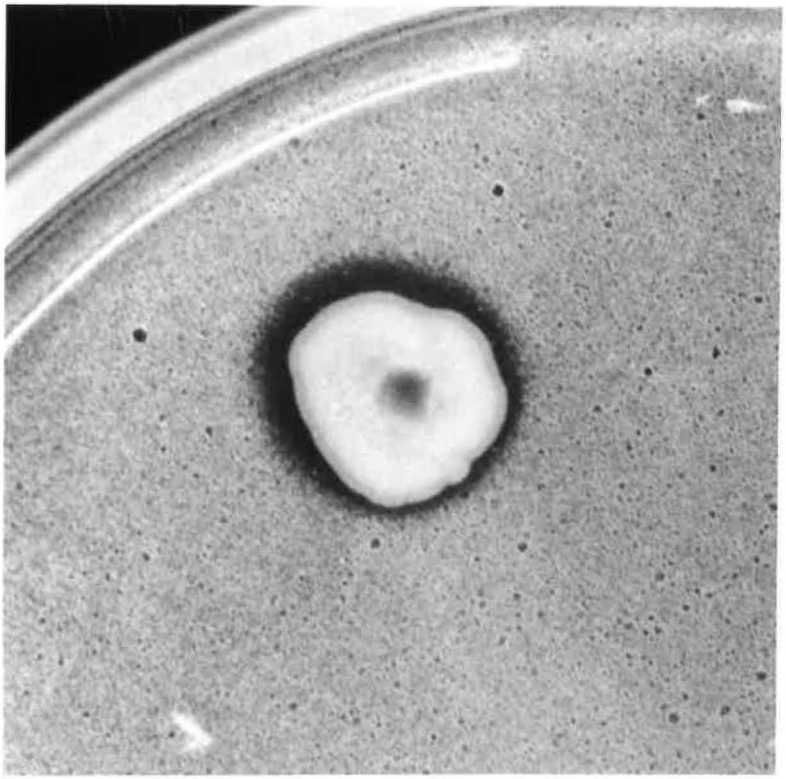

FIGURE 12 : Formation d'une zone claire dans le film d'acénaphtylène autour d'une colonie de la souche G_6 sur milieu BHYT (KNO_3).

Tableau I. Evaluation du potentiel de transformation des HAPs en conditions aérobies sur milieu solide

HAP :	Naphtalène	Acénaphtylène	Fluorène	Phénanthrène
I_1	vol.	+	-	+
I_6	vol.	+	+	-
I_7	vol.	+	+	+
G_1	vol.	+	-	-
G_3	vol.	vol.	+	+
G_4	vol.	+	-	+
G_6	vol.	+	+	+
G_7	+	+	-	+
G_8	+	+	-	+
G_9	vol.	vol.	-	+
G_{10}	vol.	vol.	-	+
G_{12}	vol.	vol.	-	+

vol. = Volatilisation du HAP avant l'apparition d'une zone claire

\+ = Apparition d'une zone claire autour des colonies

Tableau II. Evaluation du potentiel de transformation des HAPs en conditions anaérobies sur milieu solide

HAP:	Naphtalène	Acénaphtylene	Fluorène	Phénanthrène
I_1	vol.	-	-	+
I_2	vol.	-	-	+
I_6	vol.	+	-	-
I_7	vol.	+	-	-
G_4	vol.	+	-	-
G_6	vol.	+	-	-
G_{11}	vol.	+	-	+

vol. = Volatilisation du HAP avant l'apparition d'une zone claire

\+ = Apparition d'une zone claire autour des colonies

souches testées dues à un temps d'incubation plus long en conditions anaérobies.

4.4 Caractérisation des souches ayant montré un certain potentiel de transformation des HAPs

Une caractérisation des souches ayant démontré une activité envers un HAP en conditions anaérobies a été effectuée. Les résultats sont présentés au tableau 3. On remarque que toutes les souches sont de morphologie semblable et qu'elles sont toutes Gram négatives. Les souches I_6, I_7 et G_6 ont été identifiées au genre *Pseudomonas fluorescens*. La souche G_4 a été identifiée comme étant *Pseudomonas* tandis que la souche G_{11} a été identifiée comme étant *Alcaligenes*. Par contre, l'identification des souches I_1 et I_2 a été plus difficile. Ainsi le genre de la souche I_1 est soit *Achromobacter* ou *Alcaligenes* alors que la souche I_2 a été identifiée comme étant soit *Achromobacter* ou *Pseudomonas*. Les caractéristiques biochimiques déterminées à l'aide des galeries API 20E utilisés pour tenter d'identifier ces souches sont présentées au tableau 4.

Les courbes de croissance anaérobie des souches G_4 et G_6 sont présentées aux figures 13 et 14 respectivement. On peut voir qu'en conditions anaérobies, la croissance maximale à 540 nm a été observée après 78 heures pour la souche G_6. Pour

Tableau 3. Caractérisation des souches positives au test de vaporisation de HAPs sur milieu solide anaérobie

Souches :	Morphologie :	Gram :	Genre bactérien :
I_1	Bâtonnet court	-	*Achromobacter ou Alcaligenes*
I_2	Bâtonnet court	-	*Achromobacter ou Pseudomonas*
I_6	Bâtonnet moyen	-	*P. fluorescens*
I_7	Bâtonnet moyen	-	*P. fluorescens*
G_4	Bâtonnet court (polymorphe)	-	*Pseudomonas*
G_6	Bâtonnet moyen	-	*P. fluorescens*
G_{11}	Bâtonnet court	-	*Alcaligenes*[1]

1 : Identifié par le laboratoire de G. Paquette, Institut Armand-Frappier.

Tableau IV. Caractéristiques biochimiques déterminées selon le test API 20E pour les souches sélectionnées par le test de transformation des HAPs sur milieu solide anérobie

Tests :	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OXI	NO2	N2	MOT	MAC	OF-O	OF-F
I_1	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	N.D.	N.D.
I_2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	N.D.	N.D.
I_6	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	N.D.	N.D.
I_7	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	N.D.	N.D.
G_4	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	N.D.	N.D.
G_6	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-
G_{11}	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	N.D.	N.D.

Abréviations : ONPG: *o*-Nitrophényl-*β*-D-galactopyranoside; ADH: Arginine dihydrolase; LDC: Lysine décarboxylase; ODC: Ornithine décarboxylase; CIT: Citrate; H2S: Sulfate d'hydrogène; URE: Uréase; TDA: Tryptophane désaminase; IND: Indole; VP: Voges- Proskauer; GEL: Gélatine; GLU: Glucose; MAN: Mannose; INO: Inositose; SOR: Sorbitol; RHA: Rhamnose; SAC: Sucrose; MEL: Melibiose; AMY: Amygdaline; ARA:Arabinose (L+); OXI: Oxidase; NO2: Nitrite; N2: Azote(gaz); MOT: Mobilité; MAC: MacConkey; OF-O: oxidation; OF-F: Fermentation

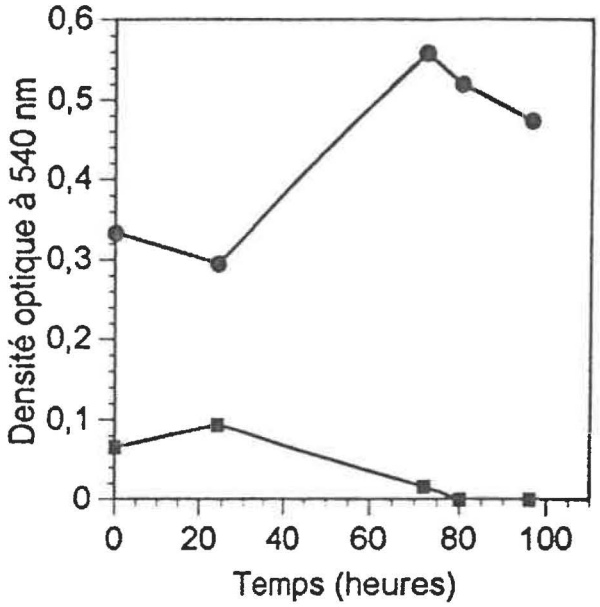

Figure 13. Courbe de croissance de la souche G_4 dans le milieu BHYT (KNO_3) anaérobie à 29°C et à l'obscurité. La croissance a été évaluée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 540 nm à partir de deux cultures ayant des comptes bactériens initiaux différents.

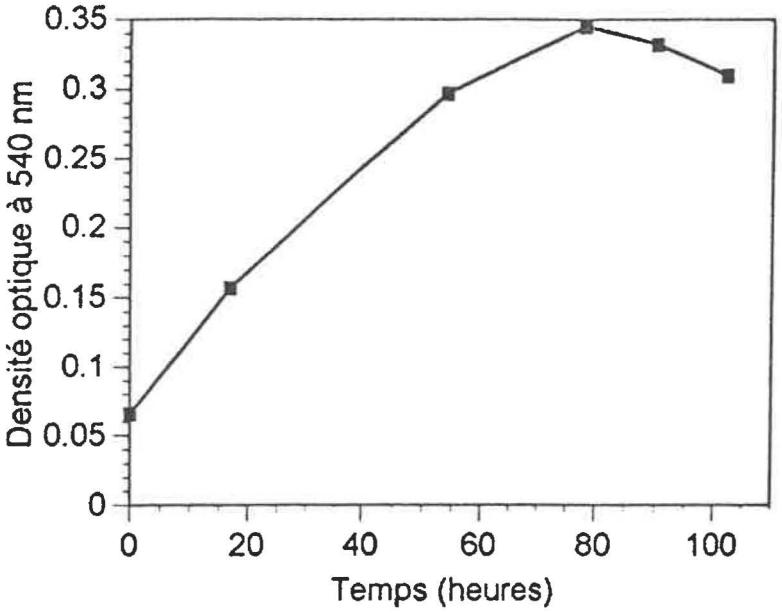

Figure 14. Courbe de croissance de la souche G_6 dans le milieu BHYT (KNO_3) anaérobie à 29°C et à l'obscurité. La croissance a été évaluée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 540 nm.

la souche G_4, la croissance observée a été relativement faible dans les conditions utilisées. La figure 15 présente la courbe de croissance en conditions aérobies des souches I_6, I_7, G_4 et G_6. On peut voir que le maximum de la croissance bactérienne est obtenu après 18 heures pour les souches I_7 et G_6, tandis la croissance continue jusqu'à 32 heures pour la souche I_6 et G_4.

5. Essai de biodégradation des HAPs par les souches purifiées

5.1 Essais de biodégradation des HAPs adsorbés sur sable de silice

5.1.1 Mise au point de la méthode d'extraction

À la figure 16, on présente les résultats de l'extraction à l'éther du phénanthrène en milieu acide (pH = 2), en milieu saturé de NaCl et en milieu acide et saturé de NaCl lorsque l'on utilise 2 et 5 grammes de silice comme support. On remarque que lorsque l'on utilise 5 grammes de silice, l'emploi de conditions acides diminue légèrement la quantité de phénanthrène récupérée tandis que la saturation au NaCl avec ou sans acide diminue respectivement de 28 et 38% la quantité de phénanthrène récupérée. Par contre, ces trois conditions semblent favoriser l'extraction du phénanthrène lorsque l'on utilise 2 grammes de silice comme support mais si l'on tient compte des écart-types, calculés à partir de quadriplicatas, ces différences ne sont pas significatives.

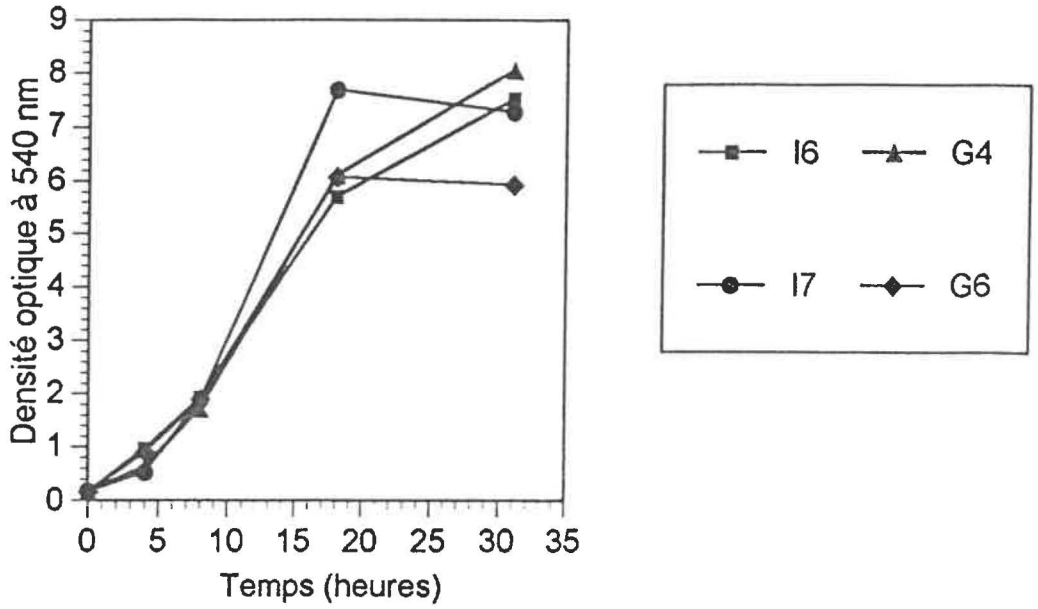

Figure 15. Courbe de croissance des souches I_6, I_7, G_4 et G_6 dans le milieu BHYT (KNO_3) incubé en conditions aérobies dans un incubateur rotatif à 29°C et à l'obscurité. La croissance a été évaluée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 540 nm.

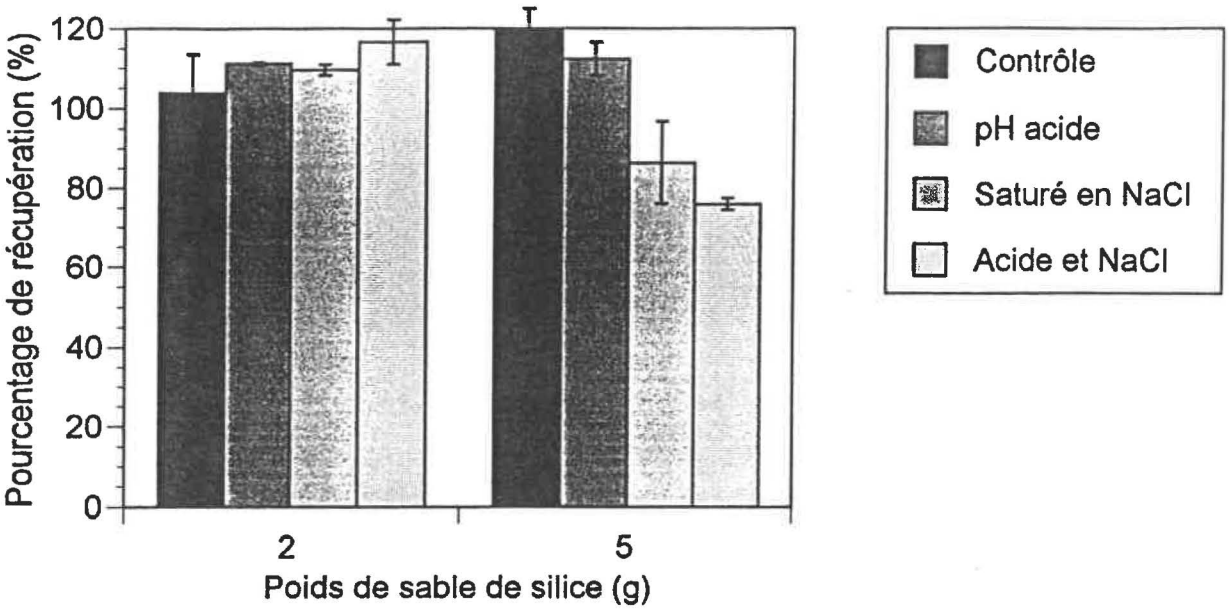

Figure16. Effet de la saturation en NaCl et du pH acide du milieu combiné ou non sur le pourcentage de récupération du phénantrène obtenu à partir de l'extraction à l'éther (1:1)(v:v) d'échantillons de milieu BH (KNO_3) contenant 150 mg/L de phénantrène adsorbé sur 2 ou 5 grammes de sable de silice.

La figure 17 montre la relation existant entre le temps d'agitation et le pourcentage d'extraction du phénanthrène. On peut voir qu'après 45 secondes d'agitation la quantité maximale de phénanthrène pouvant être récupérée est atteinte et se situe autour de 82%. L'effet de la stérilisation par autoclavage du milieu BH (KNO_3) contenant 150 mg/L d'acénaphtylène, de fluorène et de phénanthrène adsorbés sur 3 grammes de silice a été étudié (figure 18). L'acénaphtylène est affecté par la stérilisation car on observe une diminution du pourcentage de récupération de près de 15% en aérobie et de plus de 50% en anaérobie (lorsque la bouteille contenant le sable est rendue anaérobie par trois lavages sucessifs avec du gaz contenant 10% de H_2, 10% de CO_2 et 80% de N_2 avant la stérilisation) tandis que le fluorène et le phénanthrène ne le sont pas, le pourcentage de récupération ne diminuant pas significativement que ce soit en aérobie ou en anaérobie. De plus, on observe à cette figure que le pourcentage de récupération de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène est, avant stérilisation, de 75, 84 et 78% respectivement.

5.1.2 Suivi des essais

5.1.2.1 Essais avec les sept souches actives en anaérobies.

Les sept souches, qui démontraient une activité envers un HAP sur milieu solide en conditions anaérobies, ont été testées en milieu liquide $BH(YT)_{1/10}$ (KNO_3) anaérobie avec leur HAP

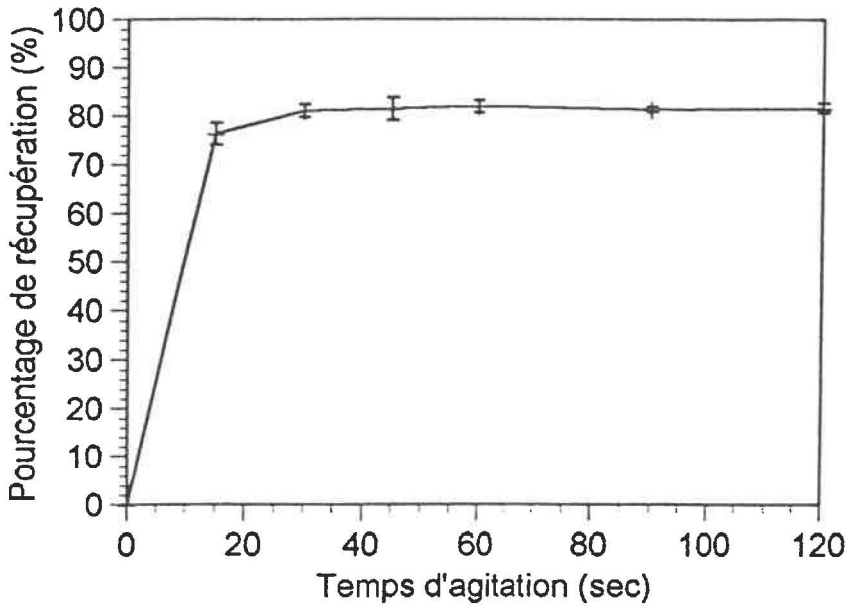

Figure 17. Effet du temps d'agitation sur le pourcentage de récupération du phénantrène obtenu à partir de l'extraction à l'éther (1:1)(v:v) d'échantillons de milieu BH (KNO_3) contenant 150 mg/L de phénanthrène adsorbé sur 3 grammes de sable de silice.

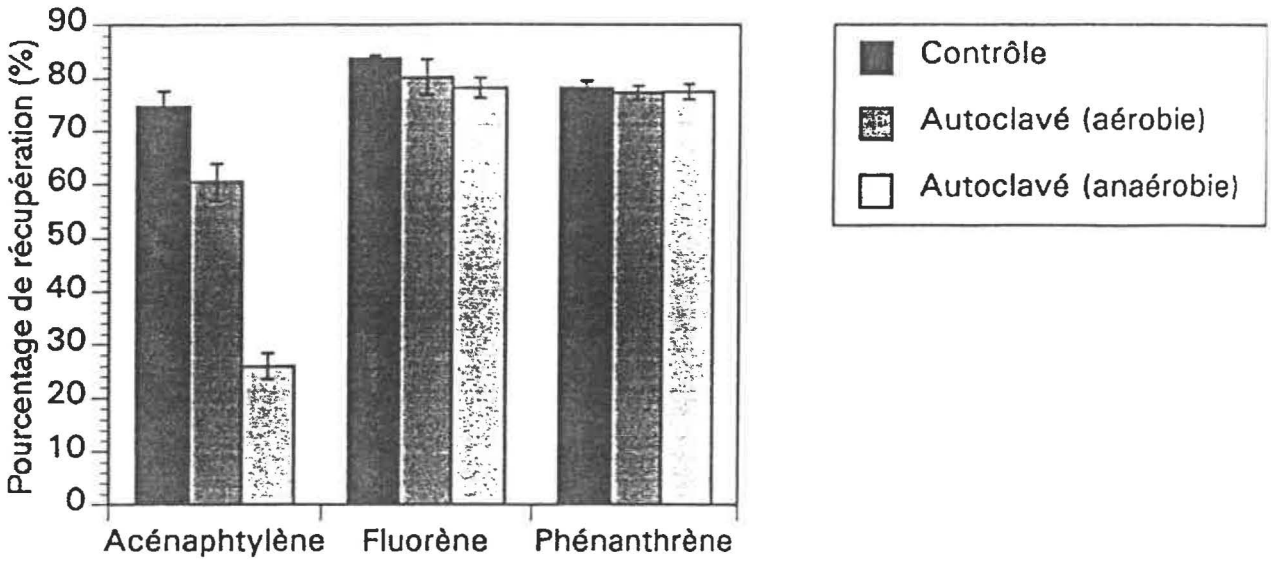

Figure 18. Effet de la stérilisation (121°C, 15 min.) sur le pourcentage de récupération des HAPs à partir de l'extraction d'échantillons de milieu BH(KNO_3) contenant 150 mg/L de HAP adsorbé sur 3 grammes de sable de silice.

respectif adsorbé sur la silice. Aucune biodégradation n'a pu être observée sur une période de 93 jours pour la souche I_1, 108 jours pour la souche I_2, 76 jours pour la souche I_6 et I_7, 100 jours pour la souche G_4, 135 jours pour la souche G_6 et 93 jours pour la souche G_{11}. Une diminution de la concentration, variant entre 10 et 40%, a été observée dans les bouteilles biotiques des essais de biodégradation de l'acénaphtylène mais cette diminution était égale ou inférieure à celle observée dans les contrôles abiotiques. Une faible augmentation du pH, la plus élevée étant de 7,01 à 7,58, a été observée pour toutes les souches à l'exception de la souche G_{11}. Des énumérations bactériennes ont montré que les comptes bactériens se situait entre 10^7 et 10^8 UFC par mL au temps zéro puis se maintenait entre 10^5 et 10^7 UFC par mL après 30 jours d'incubation et qu'au dernier temps d'analyse les comptes bactériens avait diminué à moins de 10^4 UFC par mL.

La vérification de l'activité de chaque souche face au HAP selon la méthode de vaporisation sur milieu solide, effectuée à partir des colonies obtenues des comptes bactériens (30 jours), a montré que chaque souche avait conservé leur activité de formation d'une zone claire.

5.1.2.2 Essais des différentes conditions avec la souche G_6

Les essais effectués avec la souche G_6 ont été suivis sur

une période de 7 semaines. Par contre aucune dégradation de HAP, supérieure à celle des témoins abiotiques, n'a pu être observée dans les bouteilles biotiques. La concentration de naphtalène et d'acénaphtylène des essais aérobies a diminué suffisamment pour ne plus être détectable après 28 jours pour le test en milieu pauvre avec Inipol (0,2%) et après 42 jours pour le test contrôle (milieu pauvre sans Inipol). Cette diminution a été observée autant dans les bouteilles biotiques que dans les témoins abiotiques.

Le compte bactérien a diminué en trois semaines à moins de 10^4 UFC par mL dans tous les tests à l'exception d'un test effectué en milieu pauvre aérobie. Aucune croissance bactérienne n'a pu être observée par la suite dans cette série de test. Le suivi du pH montre qu'en conditions anaérobies le pH s'est élevé lentement passant d'environ 7,15 à 7,6 tandis qu'en conditions aérobies, il est demeuré stable. Par contre, les tests qui utilisaient l'Inipol montre à cette égard une certaine différence, le pH ayant monté en seulement deux semaines à 7,6 en conditions anaérobies tandis qu'il a baissait légèrement à 6,85 en aérobie. De plus, lors de ce dernier test, soit en conditions aérobies avec Inipol, une coloration jaune-orange est apparue dans les bouteilles biotiques tandis qu'aucun changement de coloration n'a été observé dans les bouteilles abiotiques.

La présence d'une substance graisseuse normalement observée lors de l'extraction des bouteilles contenant du tween 20 n'a pu être observé à partir de la deuxième semaine dans les bouteilles biotiques tandis qu'elle était toujours présente dans les témoins abiotiques.

5.1.2.3 Essais de biodégradation de l'acénaphtylène avec la souche G_6

Les énumérations bactériennes effectuées pour les tests A1 et A2 ont montré que le compte bactérien au départ était respectivement de 1,3 X 10^7 UFC/mL et 5,9 X 10^6 et qu'il est tombé à moins de 1 X 10^2 UFC/mL après trois semaines sans qu'une biodégradation de l'acénaphtylène n'ait été observée. Les tests A3 et A4 ont été suivis sur 71 jours et le compte bactérien s'est maintenu à plus de 1,1 X 10^5 UFC/mL durant cette période pour le test A3 et à plus de 2,9 X 10^7 durant les 30 premiers jours pour le test A4. Le pH du test A3 est resté stable tout au long du test tandis que le pH du test A4 est passé de 7,23 à 7,48 en 71 jours. Une diminution de près de 50 et de 26% de la concentration de l'acénaphtylène a été observée dans les bouteilles, tant biotiques que abiotiques, des tests A3 et A4 respectivement.

6. Essais sur la productivité de biosurfactants par les souches purifiées

Lors du *drop-collapsing test*, les surnageants de culture des souches isolées obtenus après la centrifugation sont restés stables et ont conservé leur forme arrondie sur la surface recouverte d'huile. Les résultats des tensions de surface mesurées à l'aide du tensiomètre sont présentés au tableau 5. On peut voir que la tension de surface d'aucun surnageant de culture, à l'exception de celui du contrôle positif (UG_2), ne diminue significativement. Les échantillons provenant des cultures avec les souches G_4 et I_7 donnent la plus faible tension de surface, soit 57, mais celle-ci reste négligeable par rapport à celle mesurée pour l'échantillon provenant de la souche contrôle (UG_2), soit 31. Ces résultats suggèrent que dans les conditions de culture utilisées, les souches G_6, G_4, I_6 et I_7 ont montré peu ou pas de production de surfactants.

TABLEAU V. Tension de surface du surnageant de culture enregistrée après 7 jours d'incubation dans du milieu BH contenant 2% de glucose

Souches	Tension de surface (mN/m^2)
G_6	67
G_4	57
I_6	62
I_7	57
UG_2	31
Témoin	75

DISCUSSION

1. Méthodes d'analyses

Deux méthodes d'analyses ont été mises au point et utilisées au cours de cette étude soit par HPLC et par chromatographie en phase gazeuse. Dans le cas des analyses par HPLC, l'utilisation d'une phase mobile ayant un ratio acétonitrile:eau 60:40 (v:v) tel que suggèré par Mihelcic et Luthy (1988a) n'a pas permis une séparation suffisante des quatre HAPs par contre cette séparation a été obtenue avec un ratio de 50:50 (v:v). L'utilisation de la longueur d'onde d'absorption maximale du naphtalène et de l'acénaphtylène a permis d'augmenter la sensibilité du dosage de 80% et de l'acénaphtylène de 1640% par rapport à la longueur d'onde de 254 nm utilisée par Mihelcic et Luthy (1988a).

Dû à la disponibilité de l'appareillage et du nombre élevé de dosages à effectuer, une méthode d'extraction et d'analyse par GC a également été développée. Les premiers essais d'extraction des trois HAPs, acénaphtylène, fluorène et phénanthrène, en utilisant le naphtalène comme standard interne, ne donnaient qu'une faible récupération, soit moins de 50%. Ces rendements étaient encore plus faibles lorsque deux extractions, et donc deux évaporations sous jet d'azote, étaient effectuées. Ainsi l'extraction fut modifiée de façon à éliminer l'évaporation, ce qui a augmenté significativement son rendement et ce plus particulièrement pour l'acénaphtylène, le

HAP le plus volatil des trois.

L'introduction du standard interne avant l'extraction semble favoriser une meilleure récupération des trois HAPs mais en fait il s'agit plutôt d'une surévaluation des concentrations extraites puisque l'on obtient pour le fluorène et le phénanthrène des concentrations, 131 et 185 mg/L, nettement supérieures à la réalité, soit 100 mg/L. Le pourcentage de récupération du naphtalène semble donc inférieur à celui des trois autres HAPs et il était donc préférable de l'incorporer à l'échantillon après l'extraction. Ainsi le standard interne peut corriger les pertes possibles lors de l'injection automatique de l'échantillon ou les modifications de concentrations encourues s'il y a évaporation du solvant préalablement à son dosage au GC.

Pour les tests effectués avec les souches purifiées il a été convenu d'ajouter le standard interne à l'éther d'extraction de façon à simplifier les manipulations. De plus, le pyrène, un HAP de quatre cycles, a été choisi comme standard interne puisqu'étant un HAP légèrement plus lourd et donc moins volatil que les quatre HAPs utilisés, il sortait à la fin du chromatographe sans interférer avec les pics de ceux-ci ou de ceux des intermédiaires de dégradation que nous aurions pu observer.

2. Biodégradation anaérobie des HAPs dans les bioréacteurs

Une biodégradation anaérobie de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène semble avoir été obtenue lors des essais effectués à partir d'échantillons de culture prélevés dans les bioréacteurs H2 (figure 4) et H4 (figure 5). La disparition des HAPs était supérieure, pour H2, de 49, 69 et 68% et pour H4, de 34, 46 et 46% à celle obtenue dans les témoins abiotiques correspondants. Par ces résultats, ce test nous a permis de voir qu'il y avait dans les bioréacteurs une activité de dégradation des HAPs et donc d'enrichissement des microorganismes.

Le tween 60 à une concentration de 100 mg/L semble favoriser la biodégradation de ces HAPs puisqu'elle est environ 20% plus élevée que dans les bouteilles sans tween 60. Les taux d'utilisation du phénanthrène obtenus, soit 0,14 ppm/h avec H2 et 0,11 ppm/h avec H4 sont inférieurs à celui obtenu par Guerin et Jones (1988) (0,46 ppm/h) avec une souche de *Mycobacterium* et les mêmes concentrations de phénanthrène et de tween mais incubé à 18°C en conditions aérobies. Des taux de dégradation plus élevés ont été obtenus plus récemment en conditions aérobies par plusieurs auteurs (Keuth et Rehm, (1991), 12,8 ppm/h de phénanthrène; Moller et Ingvorsen, (1993), 4,6 ppm/h de phénanthrène).

Seul Samson *et al.* (1991) ont rapporté avoir obtenu la dégradation de l'acénaphtylène et du fluorène en conditions dénitrifiantes, mais les taux de dégradation obtenus, respectivement 0;015 et 0,012 ppm/h, sont inférieurs à ceux que nous avons obtenus soit respectivement 0,044 et 0,074 ppm/h avec le réacteur H_2 sans tween et 0,020 et 0,042 ppm/h avec le réacteur H_4 sans tween. La différence est beaucoup plus grande lorsque le tween est utilisé puisque 0,10 et 0,17 ppm/h ont été obtenu avec le réacteur H_2 et 0,07 et 0,13 ppm/h ont été obtenu avec le réacteur H_4, respectivement pour l'acénaphtylène et le fluorène. Mihelcic et Luthy, (1988a et 1988b), Bauer et Capone (1988) et Al-Bashir *et al.* (1990) ont aussi obtenu la dégradation de HAPs en conditions dénitrifiantes, soit le naphtalène et l'acénaphtène, tel que décrit dans la revue de littérature. La dégradation des HAPs en conditions méthanogéniques n'a pas été obtenue malgré plusieurs essais sur de longue période (Mihelcic et Luthy (1988a), Bauer et Capone (1985), Delfino et Miles (1985) et Samson *et al.* (1991)).

On peut aussi voir que cette biodégradation s'est effectuée durant les quatorze premiers jours suivant l'inoculation initiale pour ensuite s'arrêter. Après cette période, seul le pourcentage de disparition du témoin abiotique a augmenté pour l'essai avec H2 tandis qu'il a également augmenté de façon équivalente ou supérieure au pourcentage de

disparition des cultures biotiques de H4. La vérification du pH des cultures biologiques à la fin de l'expérience a montré qu'un pH physiologique subsistait, ainsi l'arrêt de la biodégradation n'est donc pas conséquente à une variation du pH.

Par contre, l'utilisation de cette première culture comme inoculum pour enrichir les microorganismes n'a donné que peu de transformation des HAPs dans les essais subséquents. Ces résultats suggèrent que l'activité des microorganismes ne peut se maintenir. La biodégradation anaérobie peut entrainer l'accumulation de substances pouvant inhiber le métabolisme bactérien tel que les acides gras volatils et l'ammoniac (Parkin et Owen, 1986) et de sulfites pouvant inhiber spécifiquement la dénitrification (Knowles, 1982). Il est également possible que ces microorganismes aient des exigences nutritives particulières non retrouvées dans les conditions de cultures utilisées, ce qui aurait entraîné une perte de leur viabilité. Ainsi, Otte *et al.* (1994) ont montré que la présence de sol, même lorsqu'il était stérilisé, était essentielle pour la biodégradation aérobie du pentachlorophénol et du créosote. Le sol pourrait agir comme support pour la biomasse ou pour le substrat ce qui aurait pour effet d'augmenter l'activité bactérienne et de réduire la toxicité du substrat. Ou encore, il pourrait servir comme source de certains nutriments

essentiels pour les microorganismes. L'absence de sol entrainerait la perte de l'activité de dégradation du consortium. Il est donc possible que les dilutions effectuées avant les tests subséquents soient responsables de la perte de l'activité de dégradation observée lors des premiers tests.

La faible quantité de HAPs restant dans les cultures biotiques du premier essai, après quatorze jours d'incubation, a pu amené une diminution de la biodisponibilité des HAPs vu leur faible solubilité et qu'une partie de ceux-ci devait être adsorbés aux parois. Ainsi une forte mortalité des bactéries a pu survenir entre le 14^{e} et le 24^{e} jours de ce test puisque les HAPs étaient les seules sources de carbones présentes. Ainsi lors du repiquage, les bactéries du premier essai essentielles à la dégradation des HAPs étaient peut-être déjà mortes ou trop diluées pour redémarrer une deuxième culture. De plus, Guerin et Jones (1988) ont déjà montré que le tween 60 pouvait être hydrolysé, il est donc possible que le tween ait été dégradé par les microorganismes amenant une diminution de son activité surfactante qui aurait conduit à une diminution de la biodisponibilité des HAPs et aux variations de concentrations observés lors du deuxième essai, tant dans les bouteilles biotiques que dans les contrôles abiotiques.

Ces premiers essais de biodégradation effectué à partir d'inoculums provenant des bioréacteurs ont été effectués dans

des bouteilles de 80 mL et nous ont permis de réaliser qu'il serait préférable d'utiliser des bouteilles à sérum de faible volume et d'extraire la bouteille au complet lors de chaque analyse. Ainsi, par l'extraction complète de la bouteille, tel que suggéré par Weissenfels *et al.* (1992) et Ellis *et al.* (1990), les problèmes d'échantillonnages conséquents de la non-solubilité et de l'adsorption des HAPs étaient évités.

3. Isolement de souches pures

Les essais d'isolement sur milieu solide ne contenant qu'un HAP comme unique source de carbone, n'ont pas donné les résultats escomptés. La croissance identique observé sur les milieux avec ou sans HAP suggérait que les microorganismes utilisaient une autre source de carbone. Cette source de carbone a pu provenir des traces de méthanol (0,04 mL par pétri) utilisé pour la dissolution des HAPs, d'impuretés dans l'agar ou de substances volatiles présentes dans l'atmosphère. Ces milieux étaient anaérobies et, par conséquent, ont été incubés dans la chambre anaérobie ou encore dans une jar et donc dans un espace clos et restreint. Ainsi l'atmosphère a pu être contaminé par l'évaporation du naphtalène ou encore de tout autre composé organique volatil utilisé dans la chambre anaérobie et a pu servir de source de carbone aux bactéries ensemencées sur ces milieux comme l'a déjà suggèré Bogardt et Hemmingsen (1992). La croissance sur les milieux ne contenant

aucune source de carbone a donc pu provenir d'un contaminant de l'atmosphère.

Une première sélection de souches potentiellement actives envers les hydrocarbures et les HAPs a été effectuée avec le test de croissance en conditions anaérobies dans un milieu minimal en présence d'une goutte d'huile (contenant ou non du naphtalène) comme source de carbone. L'activité des souches purifiées a ensuite été déterminée envers certains HAPs avec le test de transformation des HAPs sur milieux solides selon une modification de la méthode mise au point par Kiyohara *et al.* (1982). Par contre, cette méthode s'est avéré moins facilement utilisable avec le naphtalène et l'acénaphtylène. Ces deux HAPs étant très volatils, l'observation des zones d'hydrolyse était plus difficile à cause du temps nécessaire pour la croissance bactérienne et la formation des zones claires. Ceci a surtout été observé en conditions anaérobies car la croissance des bactéries y était beaucoup plus lente.

Comme notre objectif était d'isoler plusieurs souches démontrant un potentiel de dégradation envers un ou plusieurs HAPs en conditions anaérobies, la méthode de vaporisation sur milieux solides s'est avérée très utile pour effectuer le criblage de ces souches à partir des cultures en milieu minimal avec goutte d'huile. De plus, nous devons souligner qu'à notre connaissance c'est la première fois que ce test est utilisé

pour isoler des bactéries en conditions dénitrifiantes. Il semble donc que la formation de la zone claire soit indépendante de la présence de l'oxygène, tout au moins pour les bactéries que nous avons isolées.

L'acénaphtylène et le phénanthrène semblent plus succeptibles que le fluorène à la transformation sur milieux solides par les bactéries utilisées (tableau 1 et 2). Ceci correspond à ce que l'on retrouve dans la littérature pour la dégradation en milieu liquide. En effet, Boldrin *et al.* (1993) ont isolé une souche de *Mycobacterium* capable d'utiliser le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie mais qui ne pouvait dégrader le fluorène que cométaboliquement. Weissenfels *et al.* (1990) ont isolé une souche de *Pseudomonas* capable d'utiliser le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie et une autre souche de *Pseudomonas* nécessitant de la cobalamine comme source additionnelle de carbone.

Le genre bactérien des souches isolées correspond à ce qui a déjà été décrit dans la littérature pour la dégradation aérobie. *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Alcaligenes* sont des genres bactériens capables de dégrader des hydrocarbures en conditions aérobies, et ont été fréquemment isolés dans les sols contaminés par ces xénobiotiques (Bartha et Atlas, 1977; Leahy et Colwell, 1990; Keuth et Rehm, 1991; Moller et

Ingvorsen, 1993).

4. Essais de biodégradation avec les souches purifiées

4.1 Essais avec les HAPs adsorbés sur le silice

L'adsorption des HAPs sur le sable de silice ne nécessite pas de conditions particulières d'extraction à l'éther (1:1)(v:v) si ce n'est qu'une agitation minimale au vortex de 45 secondes est requise pour s'assurer d'extraire un maximum de HAP (figure 15 et 16). Bien que plusieurs auteurs aient affirmés que l'autoclavage à 120°C durant 20 minutes n'avait pas d'effet sur les HAPs dans le sol (Yong *et al.* 1991), la stérilisation par autoclavage (121°C, 15 min.) du sable de silice après y avoir adsorbé les HAPs, malgré qu'elle aurait simplifiée les manipulations n'a pas été utilisée car elle produit une perte significative d'acénaphtylène (figure 17).

4.2 Confirmation de l'activité de transformation des HAPs en milieu liquide

Malgré, un suivi prolongé de la concentration en HAPs, jusqu'à 135 jours avec la souche G6, l'activité obtenue sur milieu solide n'a pu être confirmée pour aucune souche en milieu liquide avec les HAPs adsorbés sur le sable de silice. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces résultats.

Premièrement, les résultats obtenus au test de transformation sur milieux solides pourraient être des faux-positifs, certains auteurs ayant signalé de tels résultats lors de ce test (MacGillivray et Shiaris, 1993; Shiaris et Cooney, 1983). Les zones claires observées ont pu provenir d'une solubilisation du HAP conséquence d'une activité biosurfactante d'une substance sécrétée par les bactéries isolées et non pas d'une activité enzymatique de dégradation. C'est pour vérifier cette hypothèse que le test de productivité de biosurfactant a été effectué. Mais comme on a pu le constater, aucune des souches ne semble sécrèter de biosurfactant puisque la tension de surface des surnageants n'a pas diminué significativement.

Deuxièmement, les HAPs adsorbés sur le silice ne sont peut-être plus disponibles pour les bactéries. Wodzinski et Bertonili (1972) et Wodzinski et Coyle (1974) ont respectivement déterminé que le naphtalène et le phénanthrène n'étaient utilisés par les bactéries que sous la forme dissoute. L'adsorption des HAPs a donc pu empêcher leur dégradation malgré que l'adsorption de ces derniers sur le sol est proportionnelle à la concentration en matière organique du sol (Mihelcic et Luthy, 1988), qui dans le cas de nos essais, est pratiquement nulle puisque elle est effectuée sur du silice. L'utilisation du silice comme support devait servir à augmenter la biodisponibilité des HAPs, malgré leur faible

solubilité, en augmentant la surface de contact, comparativement aux granules de HAP obtenus par précipitation, tout en conservant une faible adsorption, vu l'absence de matière organique. Weissenfels *et al.* (1992) suggèrent que les HAPs soient non-biodisponibles lorsqu'adsorbés sur la matière organique du sol, il est donc possible que l'adsorption sur le silice ait affecté la biodisponibilité des HAPs.

Troisièmement, les bactéries auraient pu perdre leur activité lors de la préparation de l'inoculum. La production de la biomasse de départ se faisant dans le milieu non-sélectif BHYT (KNO_3), les bactéries ont pu perdre leur activité lors de leur culture dans ce milieu tout en continuant leur croissance. Par contre, cette hypothèse s'est avérée erronée puisqu'une vérification de l'activité de formation de zone claire a montré que toutes les souches avaient conservé leur activité durant les tests en milieu liquide. De plus, lors de la dernière série de tests effectués avec la souche G_6, la préparation de l'inoculum s'est effectuée dans un milieu auquel de l'acénaphtylène a été ajouté de façon à maintenir une pression sélective. Par contre, Moller et Ingvorsen (1993) ont obtenu un résultat semblable avec la souche du genre *Alcaligenes* (*i.e.* survie durant 50 jours mais sans dégradation de HAPs) qui avait été isolée par la même méthode, soit celle de la transformation de HAPs sur milieux solides.

Quatrièmement, le changement de milieu, de solide à liquide, amène plusieurs différences au niveau des conditions d'incubation, ce qui a pu nuire à l'activité bactérienne. En effet, en milieu liquide les bactéries sont dispersées tandis qu'elles sont concentrées sous forme de colonies lors du test de transformation sur milieux solides. La mince couche de HAP obtenue sur milieu solide après vaporisation pourrait faire en sorte que le HAP serait ainsi plus facilement accesssible aux bactéries que sous la forme d'un précipité en milieu liquide. De plus, si la bactérie a une faible productivité de biosurfactant, comme c'est le cas avec les souches que nous avons purifiées, il se peut que la forte concentration de bactéries à l'intérieur d'une colonie favorise la solubilisation et la biodégradation du HAP qui entre en contact direct avec cette colonie.

4.3 Essais avec la souche G_6

Comme la composition du milieu utilisée lors des cultures en milieu solide ne semblait pas favoriser la dégradation des HAPs en milieu liquide, différentes variables ont été testées avec la souche G_6 pour essayer de trouver les conditions pouvant la favoriser. La souche G_6 avait été choisie car elle présentait un large spectre au test de transformation en milieux solides aérobies et qu'elle produisait les plus grandes zones en conditions anaérobies. Mais aucune biodégradation n'a

pu être observée que ce soit en milieu riche ou pauvre, avec ou sans Tween 20, avec ou sans Inipol et en conditions aérobies ou anaérobies.

Par contre, la coloration jaune-orange observée dans les bouteilles biotiques du test aérobie avec Inipol semble démontrer qu'il y a eu certaines biotransformations. La coloration du milieu lors de la dégradation des HAPs est utilisée par plusieurs auteurs pour l'identification phénotypique des souches avec lesquelles ils travaillent (Foght et Westlake, (1988); Grifoll *et al.*, (1992)). Récemment, une méthode de criblage des bactéries dégradant les hydrocarbures a même été développée en se basant sur le fait que durant la biodégradation des HAPs des produits colorés (jaune-orange, verdâtre) sont synthétisés (Stieber, *et al.*, 1994).

Cette coloration a été associée à la modification du naphtalène par la souche G_6 lors d'une expérience où la souche G_6 a été incubée en triplicata avec les quatre HAPs séparément pour déterminer l'origine de cette coloration (résultats non-présentés). Des contrôles abiotiques (inoculum autoclavé 121°C, 15 min.) ont confirmé l'origine bactérienne de la coloration obtenue. Mais la volatilisation trop rapide du naphtalène, tant dans les bouteilles biotiques que dans les bouteilles abiotiques rendait difficile la confirmation de la biodégradation du naphtalène, la biodégradation étant trop

lente par rapport à l'évaporation. L'isolement de cette substance colorée et la caractérisation chimique par chromatographie en phase gazeuse gazeuse suivi d'une spectrométrie de masse pourrait confirmer qu'il s'agit bien d'un produit de transformation du naphtalène.

Des échantillons de géloses vaporisées à l'acénaphtylène, pris autour des colonies de G_6 montrant une zone claire, ont été extraits et analysés par GC/MS de façon à déterminer s'il y avait présence d'intermédiaires de dégradation de l'acénaphtylène. Les résultats préliminaires obtenus semblent démontrer la présence de tels intermédiaires mais leur identification n'a pu être complétée pour le moment. L'emploi de substance marquée soit par le C^{14} ou de l'hydrogène deutéré et le suivi des produits de dégradation dans le milieu est essentiel pour confirmer les transformations réalisées par les souches que nous avons purifiées. Par ailleurs Yang *et al.* (1994) ont récemment utilisé une technique semblable, soit l'extraction de géloses vaporisées, et ont réussi à isoler et identifier plusieurs intermédiaires de la dégradation du naphtalène, du fluorène et du phénanthrène. Cette technique semble donc tout indiquée pour prouver l'hypothèse selon laquelle ce serait les conditions particulières présentes à la surface d'une gélose qui auraient favorisé la dégradation des produits hydrophobes, que sont les HAPs, avec les souches que

nous avons isolées.

A notre connaissance, aucune souche dégradant les HAPs en conditions anaérobies n'a été isolée en culture pure. Les dégradations observées ont été obtenues au niveau des sols ou des sédiments par des flores mixtes très complexes (Samson *et al.*, (1991); Al-Bashir *et al.*, (1990); et Bauer et Capone (1988)). Deux exemples, déjà présentés dans la revue de littérature, sont encore plus frappant soit la flore mixte aérobie composée de onze souches ayant été identifiée comme étant essentielle à la biodégradation d'un HAP substitué (Rozgaj et Glancer-Soljan, 1992) et celle de la souche d'*Alcaligenes* isolée par le test de transformation des HAPs sur milieux solides, qui nécessitait la présence de sol non-stérilisé pour dégrader du phénanthrène (Moller et Ingvorsen, 1993). Les souches, que nous avons isolées, n'ont peut être pas les capacités de sécrétions de surfactants et d'enzymes pouvant solubiliser et dégrader ces substances en milieu liquide bien qu'il semble qu'elles ont montré un potentiel sur milieu solide.

Comme nous l'avons déjà mentionné, le sol pourrait avoir un rôle important à jouer comme support ou comme source de nutriments essentiels aux microorganismes (Otte *et al.*, 1994). Il serait probablement souhaitable de travailler avec des flores mixtes et après enrichissement d'identifier les

microorganismes présents et leurs rôles respectifs dans la dégradation des HAPs.

CONCLUSION

Les propriétés physico-chimiques particulières des HAPS ont obligé tout au long de ce projet la mise au point de méthodes tant au niveau des extractions et des analyses chimiques qu'au niveau des essais de biodégradation. Le caractère hydrophobe, leur faible biodisponibilité dû à leur faible solubilité, leur adsorption sur les différentes surfaces et leur volatilité sont des propriétés qui rendent difficile les travaux de biodégradation des HAPs.

Des méthodes d'extractions et d'analyses des HAPs par HPLC et par chromatographie en phase gazeuse ont été mises au point. Une biodégradation en condition de dénitrification de l'acénaphtylène, du fluorène et du phénanthrène a été observée à partir des bioréacteurs utilisés pour l'enrichissement des microorganismes à partir de sols pollués. Des souches ont été isolées pour leur capacité à produire une zone claire autour de leurs colonies sur milieu solide auquel un film de HAP avait été vaporisé à la surface. Les souches ont montré des capacités différentes à produire ces zones selon le HAP étudié et les conditions d'incubation aérobie ou anaérobie utilisées. Les différents essais de biodégradation par ces différentes souches n'ont pas permis de déterminer une activité de transformation des HAPs en milieu liquide. Dans les conditions utilisées, ces souches n'ont montré aucune capacité à produire des surfactants avec les milieux utilisés.

Bien que certaines de ces souches semblent montrer un potentiel à transformer certains HAPs, des études ultérieures seront nécessaires pour préciser les conditions favorisant leurs activités en milieu liquide. La présence d'une flore mixte et/ou la présence de certains nutriments provenant du sol pourrait favoriser l'activité de ces microorganismes.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier particulièrement mon directeur de recherche, le docteur Réjean Beaudet, mais également madame Rita Alary, monsieur Guy McSween et monsieur Louis Racine pour leur support et les précieux conseils techniques qui m'ont grandement aidés lors de mes recherches.

Merci aussi au docteur François Lépine et son attaché de recherche, monsieur Sylvain Milot pour leurs précieux conseils relatifs aux aspects plus chimiques que microbiologiques de mes recherches.

Un dernier merci à madame Ginette Denis, du laboratoire du docteur Gilles Paquette, pour son aide lors de l'isolement et la caractérisation des microorganismes.

BIBLIOGRAPHIE

Al-Bashir, B., T. Cseh, R. Leduc et R. Samson. 1990. Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions. Appl. Microbiol. Biotechnol. **34**:414-419.

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

Atlas, R. M. et R. Bartha. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. Can. J. Microbiol. **18**:1851-1855.

Atlas, R. M. 1975. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. Appl. Microbiol. **30**:396-403.

Bartha, R. et R. M. Atlas. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. Adv. Appl. Microbiol. **22**:225-266.

Bauer, J. E. et D. G. Capone. 1985. Degradation and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. **50**:81-90.

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

Berg, G., A. G. Seech, H. Lee et J. T. Trevors. 1990. Identification and characterization of a soil bacterium with extracellular emulsifying activity. J. Environ. Sci. Health. A25 **7**:753-764.

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

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

Bossert, I. et R. Bartha. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. Dans R. M. Atlas (éd.) Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., N.Y. p.434-476.

Boyd, S. A., Shelton, D. R., Berry, D. et J. M. Tiedje. 1983. Anaerobic degradation of phenolic compounds in digested sludge. Appl. Environ. Microbiol. **46**:50-4.

Braun, K. et D. T. Gibson. 1984. Anaerobic degradation of 2-aminobenzoate (Anthranilic acid) by denitrifying bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **48**:102-107.

Broda, P., R. Downing, P. Lehrbach, I. McGregor et D. Meulien. 1981. Molecular biology, pathology, and ecology of bacterial plasmids. Plenum, N.Y. 511-517.

CNRC. 1983. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans le milieu aquatique : formation, sources, devenir et effets sur la biote aquatique. Ottawa. Conseil national de recherche du Canada. 218 pages.

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

Cork, D. J. et J. P. Krueger. 1991. Transformations of herbicides and pesticides. Adv. Appl. Microbiol. **36**:1-66.

Darville, R. G. et J. L. Wilhm. 1984. The effect of naphthalene on oxygen consumption and hemoglobin concentration in *Chironomus attenuatus* and oxygen consumption and life cycle of *Tanytarus dissimilis*. Environ. Toxicol. Chem. **3**:135-141.

Delfino, J. J., et C. J. Miles. 1985. Aerobic and anaerobic degradation of organic contaminants in Florida groundwater. Proc. Soil Crop. Sci. Soc, Fla. **44**:9-14.

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

Dickhut, R. M., D. E. Armstrong et A. W. Andren. 1991. The solubility of hydrophobic aromatic chemicals in organic solvent/water mixtures: evaluation of four mixed solvent solubility estimation methods. Environ. Toxic. Chem. **10**:881-889.

Edwards, D. A. , R. G. Luthy et Z. Liu. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. **25**:127-133.

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

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

Enzminger, J. D. et R. C. Ahlert. 1987. Environmental fate of polynuclear aromatic hydrocarbons in coal tar. Environ. Technol. Letters. **8**:269-278.

EPA. 1979. Water-related environmental Fate of 129 priority pollutans. Washinton. É.U. Environmental protection agency. pages.

Evans, W. C. et G. Fuchs. 1988. Anaerobic degradation of aromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol. **42**:289-317.

Falatko, D. M. et J. T. Novak. 1992. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. Water Environ. Res. **64**:163-169.

Farrell, R. et A. M. Chakrabarty. 1979. Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Plenum, N.Y. 97-109.

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

Foght, J. M., P. M. Fedorak et D. W. S. Westlake. 1989. Mineralization of [^{14}C]hexadecane and [^{14}C]phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. Can J. Microbiol. **36**:169-175.

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

Francis, A. J., J. M. Slater et C. J. Dodge. 1989. Denitrification in deep subsurface sediments. Geomicrobiol. J. **7**:103-116.

Gamble, T. N., M. R. Betlach et J. M. Tiedje. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Appl. Environ. Microbiol. **33**:926-939.

Gauger, W. K., V. J. Srivastava, T. D. Hayes et D. G. Linz. 1991. Enhanced biodegradation of polyaromatic hydrocarbons in manufactured gas plant wastes. Gas, oil, coal, and environmental biotechnology III. Institute of gas technology, Chicago. 75-92.

Gibbs, C. F. 1975. Quantitative studies in marine biodegradation of oil. I. Nutrient limitation at 14°C. Proc. R. Soc. London Ser. B **188**:61-82.

Giddings, J. M., B. T. Walton, G. K. Eddlemon et K. G. Olson. 1977. Transport and fate of anthracene in aquatic microcosms. Dans Proceeding of the workshop: Microbial degradation of polluants in marine environments. A. W. Bourquin et P. H. Pritchard (éd.) U.S. E.P.A. 312-320.

Grbic-Galic, D. et Vogel. 1987. Transformation of toluene and benzene by mixed methanogenic cultures. Appl. Environ. Microbiol. **53**:254-260.

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

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

Hart, H. et J.-M. Conia. 1987. Introduction à la chimie organique. InterEditions. Paris. 566 pages.

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

Heitzer, R. D. et J. C. G. Ottow. 1976. New denitrifying bacteria isolated from Red Sea sediments. Mar. Biol. **37**:1-10.

Herbes, S. E. 1981. Rates of microbiol transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments in vicinity of a coal-coking waste discharge. Appl. Environ. Microbiol. **41**:20-28.

Herbes, S. E. et L. R. Schwall. 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristane and petroleum-contaminated sediments. Appl. Environ. Microbiol. **35**:306-316.

Higgins, I. J. et P. D. Gilbert. 1978. The biodegradation of hydrocarbons. Oil Ind. Microbiol. Ecosyst. Proc. Meet. 80-117.

Jafvert, C. T. 1991. Sediment- and satured-soil-associated reactions involving an anionic surfactant (dodecylsulfate). 2. Partition of PAH Compounds among phases. Environ. Sci. Technol. **25**:1039-1045.

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

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

Keith, L. H. et W. A. Telliard. 1979. Priority polluants I- A perspective view. Environ Sc. Technol. **13**:416-423.

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

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

Knowles, R. 1982. Denitrification. Microbiol. Rev. **46**:43-70.

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

Léo, A., C. Hansch et D. Elkins. 1971. Partition coefficients and their uses. Chem. Rev. **71**:525.

LePetit, J. et M. H. Barthelemy. 1968. Les hydrocarbures en mer: le problème de l'épuration des zones littorales par les microorganismes. Ann. Inst. Pasteur. **114**:149-158.

LePetit, J. et M.-H. N'Guyen. 1976. Besoins en phosphore des bactéries métabolisant les hydrocarbures en mer. Can. J. Microbiol. **22**:1364-1373.

Lovely, D. R. et E. J. P. Phillips. 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron and manganese. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1472-1480.

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

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

Mateles, R. I., J. N. Baruah et S. R. Tannebaum. 1967. Growth of thermophilic bacterium on hydrocarbons: a new source of single cell protein. Science **157**:1322-1323.

McDermott, J. B., R. Unterman, M. J. Brennan, R. E. Brooks, D. P. Mobley, C. C. Schwartz, D. D. Dietrich. 1989. Two strategies for PCB soil remediation: biodegradation and surfactant extraction. Environ. Prog. **8**:46-51.

Mihelcic, J. R. et R. G. Luthy. 1988A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons under various redox conditions in soil-water systems. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1182-1187.

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

Mix, M. C. 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants: a critical literature review. Mar. Environ. Res. **20**:1-141.

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

Morehead, N. R., B. J. Eadie, B. Lake, P. F. Landrum et D. Berner. 1986. The sorption onto dissolved organic matter in lake michigan waters. Chemosphere **15**:403-412.

Morel, F. M. M. 1983. Principles of aquatic chemistry. John Wilez & Sons, Inc. N.Y.

Mortelmans, K., S. Haworth, T. Lawlor, W. Speck, B. Tainer et E. Zeiger. 1986. Salmonella mutagenicity tests. II. Results from the testing of 270 chemicals. Environ. Mutagen. **8**:1-119.

Nozawa, T. et Y. Maruyama. 1988. Denitrification by a soil bacterium with phthalate and other aromatic compounds as substrates. J. Bacteriol. **170**:2501-2505.

Oberbremer, A., R. Muller-Hurtig et F. Wagner. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. **32**:485-489.

Olivieri, R., P. Bacchin, A. Robertiello, N. Oddo, L. Degen et A. Tonolo. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. Appl. Environ. Microbiol. **31**:629-634.

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

Parkin, G. F. et W. F. Owen. 1986. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. J. Environ. Eng. **112**:867-920.

Pritchard, P. H. et C. F. Costa. 1991. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. Environ. Sci. Technol. **25**:372-379.

Radding, S. B., T. Mill, C. W. Gould, D. H. Liu, H. L. Johnson, D.C. Bomberger et C. V. Fojs. 1976. The environmental fate of selected polynuclear aromatic hydrocarbons. E.P.A. U.S. Nat. Techn. Inf. Serv. 122 pages.

Rozgaj, R. et M. Glancer-Soljan. 1992. Total degradation of 6-aminonaphthalene-2-sulphonic acid by a mixed culture consisting of different bacterial genera. FEMS Microbiol. Ecol. **86**:229-235.

Samson, R., T. Cseh, J. Hawari, A. Demeter, B. Al-Bashir et R. Leduc. 1991. Effect of redox conditions, soil/contaminant interactions and chemical structure on the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in flooded soil. Proc. IASTED. Calgary. **183**:78-82.

Sato, T., T. Momma, Y. Ose, T. Ishikawa et K. Kato. 1983. Mutagenicity of Nagara River sediment. Mutat. Res. **118**:257-267.

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

Sims, J. L., R. C. Sims et J. E. Matthews. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. Hazardous waste and hazardous materials **7**:117-149.

Sirvins, A. et B. Tramier. 1985. La biodégradation des hydrocarbures. La Recherche. **16**:1344-1352.

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

Spain, J. C. et P. A. Van Veld. 1983. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effect of the concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. Appl. Environ. Microbial. **45**:428-435.

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

Struble, V. G. et H. J. Harmon. 1983. Molecular basis for inhibition of mitochondrial respiration by naphthalene. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **31**:644-648.

Thompson, R. H. 1971. Naturally occuring quinones. 2^{e}éd. Buttenworths Scientific Publishers, Londre. 302 pages.

Tipson, R. S. 1964. Review of oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Nat. Bur. Stand. Rep. 8363. U.S. Gov. Print. Off., Wash. D.C. 89 pages.

USNAS. 1972. Particulate polycyclic organic matter. U.S. Nat. Acad. Sci., Wash. D.C. 361 pages.

Vigon, B. W. et A. J. Rubin. 1989. Practicaled considerations in the surfactant-aided mobilization of contaminants in aquifers. J. Water Pollut. Control Fed. **61**:1233-1240.

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

Wodzinski, R. S. et D. Bertonili. 1972. Physical state in which naphthalene and bibenzyl are utilized by bacteria. Appl. Microbiol. **23**:1077-1081.

Wodzinski, R. S. et J. E. Coyle. 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. Appl. Microbiol. **23**:1077-1081.

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

Yang, Y., R. F. Chen et M. Shiaris. 1994. Metabolism of naphtalene, fluorene, and Phenanthrene: Preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. J. Bacteriol. **176**:2158-2164.

Young. L. Y. 1984. Anaerobic degradation of aromatic compounds. dans D. T. Gibson (éd.): Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, Inc., N.Y. 487-523.

Yong, R. N., L. P. Tousignant, R. Leduc et E. C. S. Chan. 1991. Disappearance of PAHs in contaminated soil from Mascouche, Québec. Dans: In situ bioreclamation. Hinchee, R. E. et R. F. Olfenbuttel. Publ. Butterworth-Heineman. (ISBN 0-7506-9301-0) 377-395.

Zeyer, J., E. P. Kuhn et R. P. Schwarzenbach. 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1,3-dimethylbenzene in absence of molecular oxygen. Appl. Environ. Microbiol. **52**:944-947.