

Philippe-Antoine Ménard

**Biodégradation du chrysène par une population bactérienne mixte isolée
d'un sol contaminé aux hydrocarbures**

Mémoire

Présenté pour l'obtention du grade de

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

BIBLIOTHÈQUE
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
531, boulevard des Prairies
Laval (Québec) Canada
H7V 1B7

Août 1998

INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES	VIII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
SOMMAIRE	XI
INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LITTÉRATURE.....	8
1. LES SOLS CONTAMINÉS.....	9
1.1 Les contaminants.....	9
1.2 Les sols contaminés au Québec.....	9
2. LES HYDROCARBURES.....	10
2.1 Les classes d'hydrocarbures	10
2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	12
2.2.1 Généralités.....	12
2.2.2 Les normes	13
3. TRAITEMENTS DES SOLS.....	15
3.1 Généralités	15
3.2 Procédés biologiques.....	15
3.3 Procédés biologiques vs autres types de traitements	18
4. MICROORGANISMES	19
4.1 Dégradant les hydrocarbures	19
4.2 Dégradant les HAP	20
4.2.1 Bactéries	21
4.2.2 Champignons.....	24
5. VOIES MÉTABOLIQUES.....	25
5.1 Bactéries	25
5.2 Champignons	27
6. PARAMÈTRES DE LA BIODÉGRADATION DES HAP.....	28
6.1 Facteurs environnementaux des sols	30
6.2 Rapport C : N : P.....	32
6.3 Biodisponibilité des HAP	32
7. LE CHRYSÈNE.....	33
7.1 Microorganismes pouvant oxyder le chrysène.....	34
7.1.1 Bactéries	34
7.1.2 Champignons	35

8.0 TECHNIQUES DE CULTURES	36
8.1 Techniques traditionnelles	36
8.2 Nouvelles approches.....	37
8.2.1 Surfactants et biosurfactants.....	38
8.2.2 Solvants organiques.....	38
8.2.3 Cultures biphasiques	40
8.2.4 Vaporisation de cristaux de HAP sur un milieu solide.....	42
8.3 Minéralisation	42
9. BIODÉGRADATION DES HAP DANS LE SOL DE LA SABLIERE THOUIN.....	43
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	45
1. SOL CONTAMINÉ.....	46
2. MICROORGANISMES	46
2.1 Flore indigène de la sablière Thouin	46
2.2 Souches de collection	48
2.2.1 Souche isolée en culture pure de la sablière Thouin	48
2.2.2 <i>Sphingomonas</i> S105 et S107	48
2.2.3 Acclimatation des souches de collection.....	49
3. CULTURES	49
3.1 Microcosmes bactériens.....	49
3.2 Microcosmes champignons.....	50
3.3 Cultures liquides bactériennes	51
3.4 Cultures liquides champignons	51
3.5 Cultures liquides-acétonitrile bactéries	52
3.5.1 Solubilité du chrysène dans une solution eau-acétonitrile.....	52
3.5.2 Tolérance des microorganismes à l'acétonitrile.....	52
3.5.3 Cultures liquides-acétonitrile-chrysène	53
3.6 Cultures biphasiques bactéries.....	53
3.7 Cultures biphasiques champignons	54
3.8 Enrichissement des cultures biphasiques bactériennes.....	54
3.8.1 Repiquages	54
3.8.2 Dilutions	55
4. MINÉRALISATION	55
5. ANALYSES CHIMIQUES.....	57
5.1 Microcosmes.....	57
5.1.1 Extraction	57
5.1.2 Chromatographie en phase gazeuse (GC)	58
5.2 Cultures liquides	59
5.2.1 Extraction	59
5.2.2 Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID).....	59
5.3 Cultures liquides-acétonitrile.....	60
5.3.1 Extraction des cultures	60
5.3.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).....	60
5.4 Cultures biphasiques.....	61
5.4.1 Choix du solvant.....	61

5.4.2	Extraction	62
5.4.3	Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)	63
5.4.4	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.	63
5.4.5	Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).	64
5.4.5.1	Détection, calibrage et quantification du chrysène.....	64
5.4.5.2	Analyse des extraits de cultures biphasiques	65
6.	CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM CHRYSÈNE	65
6.1	Spectre de pH.....	65
6.2	Spectre de biodégradation des HAP	65
6.3	Analyses microbiologiques.....	66
6.3.1	Dénombrement bactérien	66
6.3.2	Coloration Gram	66
6.3.3	Vaporisation de HAP sur des géloses	67
	RÉSULTATS.....	68
1.	CULTURES BACTÉRIENNES	69
1.1.	Microcosmes.....	69
1.2.	Cultures liquides	72
1.3.	Pertes de HAP dans les contrôles abiotiques	74
1.3.1	Dénombrement des contrôles abiotiques.....	74
1.3.2	Recouvrement des HAP	74
1.4	Cultures liquides-acétonitrile.....	78
1.4.1	Solubilité du chrysène dans une solution eau-acétonitrile.....	78
1.4.2	Tolérance des microorganismes à l'acétonitrile.....	78
1.4.3	Biodégradation.....	78
1.5	Cultures biphasiques.....	81
1.5.1	Mises au point analytiques	81
1.6	Biodégradation du chrysène par la microflore indigène isolée de la sablière.	84
1.7	Repiquages des cultures biphasiques.....	84
2.	CULTURES CHAMPIGNONS	88
2.1	Microcosmes.....	88
2.2	Cultures liquides champignons	90
2.3	Cultures biphasiques champignons	90
3.	CONSORTIUM BACTÉRIEN CHRYSÈNE	93
3.1	Dilutions des cultures biphasiques	93
3.2	Repiquages.....	93
4.	CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM CHRYSÈNE	96
4.1	Spectre de pH.....	96
4.2	Spectre de dégradation des HAP	96
4.3	Minéralisation du chrysène.....	99
4.4	Études des souches du consortium chrysène.....	105
4.4.1	Dénombrement des souches isolées du consortium chrysène.....	105
4.4.2	Coloration et observation microscopique des souches du consortium.	108
4.5	Étude de la biodégradation du chrysène par des souches isolées du consortium.	108
4.6	Vaporisation de HAP sur des milieux inoculés avec des souches du consortium.....	108
5.	SOUCHES BACTÉRIENNES DE COLLECTION.....	111

5.1 Étude de la biodégradation du chrysène en cultures biphasiques.....	111
5.1.1 Sans acclimatation aux HAP	111
5.1.2 Avec acclimatation aux HAP	111
5.1.3 Spectre de dégradation	113
DISCUSSION	119
1. BIODÉGRADATION DES HAP PAR UNE POPULATION BACTÉRIENNE MIXTE.....	120
1.1 Microcosmes	120
1.2 Cultures liquides	121
1.3 Nouvelles techniques de cultures.....	122
1.3.1 Problématique	122
1.3.2 Cultures liquides-acétonitrile.....	123
1.3.3 Cultures biphasiques	124
1.3.3.1 Mises au point analytiques	124
1.3.3.2 Biodégradation du chrysène en cultures biphasiques par une population bactérienne mixte	125
2. BIODÉGRADATION DES HAP PAR LES CHAMPIGNONS.....	127
2.1 Microcosmes.....	127
2.2 Cultures liquides	127
2.3 Cultures biphasiques.....	128
3. ÉTUDE DU CONSORTIUM BACTÉRIEN POUVANT DÉGRADER LE CHRYSÈNE EN CULTURES BIPHASIQUES	129
3.1 Enrichissement de la culture biphasique bactérienne dégradant le chrysène.....	129
3.2 Caractérisation du consortium	130
3.2.1 pH optimal.....	130
3.2.1 Spectre de dégradation de HAP	130
3.2.3 Minéralisation du chrysène.....	131
3.2.4 Souches du consortium.....	133
4. ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DE HAP EN CULTURES BIPHASIQUES PAR DES SOUCHES DE COLLECTION.	134
CONCLUSION	137
REMERCIEMENTS	140
BIBLIOGRAPHIE	141

Liste des Tableaux

	Page
TABLEAU 1 : Critères indicatifs de la contamination des sols par les HAP	14
TABLEAU 2 : Distribution des méthodes de décontamination dans 535 sites aux États-Unis	16
TABLEAU 3 : Genres bactériens et de champignons pouvant oxyder les HAP	22
TABLEAU 4 : Facteurs environnementaux affectant la biodégradation des HAP dans les sols	31
TABLEAU 5 : Caractéristiques chimiques et microbiologiques du sol de la sablière Thouin	47
TABLEAU 6 : Évaluation de la concentration du chrysène dissous dans des solutions eau-acétonitrile par chromatographie liquide à haute performance	79
TABLEAU 7 : Dénombrement des bactéries indigènes de la sablière contaminée après 48 heures d'incubation en présence de différentes concentrations d'acétonitrile	80
TABLEAU 8 : Évaluation de la concentration du chrysène extrait de solutions biphasiques (eau/huile de silicone) par chromatographie liquide à haute performance	83
TABLEAU 9 : Caractéristiques macroscopiques des souches isolées du consortium chrysène	106
TABLEAU 10 : Dénombrement des souches bactériennes composant le consortium chrysène dans 3 cultures de maintien différentes, après 14 jours d'incubation	107
TABLEAU 11 : Coloration Gram et observations microscopiques des souches isolées du consortium chrysène	109

Liste des Figures

	Page
FIGURE 1 : Structures chimiques de quelques HAP	11
FIGURE 2 : Voie métabolique générale utilisée par les bactéries pour l'oxydation des HAP	26
FIGURE 3 : Voies métaboliques générales utilisées par les champignons pour l'oxydation des HAP	29
FIGURE 4 : Biodégradation des HAP, en microcosmes, par la flore indigène de la sablière Thouin	70
FIGURE 5 : Biodégradation des HAP, en microcosmes, par la flore indigène de la sablière Thouin	71
FIGURE 6 : Biodégradation des HAP, en cultures liquides, par la microflore indigène isolée de la sablière Thouin	73
FIGURE 7 : Recouvrement des HAP extraits de milieux liquides et analysés par GC-FID équipé d'une colonne neuve	75
FIGURE 8 : Recouvrement des HAP extraits de milieux liquides et analysés par GC-FID équipé d'une colonne utilisée depuis plus de six mois	76
FIGURE 9 : Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques, par les bactéries indigènes isolées de la sablière Thouin	85
FIGURE 10 : Comparaison de la composition des milieux de cultures sur la biodégradation du chrysène en cultures biphasiques	86
FIGURE 11 : Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques, par une population bactérienne repiquée d'une culture biphasique active	87
FIGURE 12 : Biodégradation du chrysène, en culture biphasique, par la culture bactérienne de maintien après le 5 ^{ème} repiquage	89
FIGURE 13 : Biodégradation des HAP, en cultures liquides, par les champignons indigènes de la sablière Thouin	91
FIGURE 14 : Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques, par les champignons indigènes de la sablière Thouin	92

FIGURE 15 :	Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques inoculées avec des dilutions de la culture de maintien	94
FIGURE 16 :	Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques inoculées avec des dilutions du consortium chrysène	95
FIGURE 17 :	Biodégradation du chrysène par le consortium dans des cultures biphasiques ajustées à différents pH	97
FIGURE 18 :	Cinétiques de biodégradation de HAP par le consortium chrysène en cultures biphasiques	98
FIGURE 19 :	Cinétiques de biodégradation de HAP par le consortium chrysène en cultures biphasiques	100
FIGURE 20 :	Minéralisation progressives du [5,6,11,12- ¹⁴ C]-chrysène, en culture biphasique, par le consortium chrysène	101
FIGURE 21 :	Minéralisation progressive du [5,6,11,12- ¹⁴ C]-chrysène, en culture biphasique, par le consortium chrysène	103
FIGURE 22 :	Minéralisation progressive du [5,6,11,12- ¹⁴ C]-chrysène, en culture biphasique, par le consortium chrysène	104
FIGURE 23 :	Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques, par des souches bactériennes isolées des cultures de maintien du consortium chrysène	110
FIGURE 24 :	Biodégradation du chrysène par des souches bactériennes pures de collection	112
FIGURE 25 :	Biodégradation du phénanthrène par des souches bactériennes pures de collection	114
FIGURE 26 :	Biodégradation du chrysène par des souches bactériennes pures acclimatées au phénanthrène	115
FIGURE 27 :	Spectre de biodégradation des HAP de 3 et 4 cycles aromatiques par les souches 105 et 107 à partir de suspensions bactériennes acclimatées au phénanthrène	117
FIGURE 28 :	Spectre de biodégradation des HAP de 5 cycles aromatiques par les souches 105 et 107 à partir de suspensions bactériennes acclimatées au phénanthrène	118

Listes des abréviations

MEF : Ministère de l'Environnement et de la Faune (du Québec)

HAP : Hydrocarbure aromatique polycycliques

BH : Bushnell-Hass

BHA : Bushnell-Hass additionné d'amidon

BHY : Bushnell-Hass additionné d'extraits de levures

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

PCA : « Plate Count Agar »

DMF : N,N-diméthylformamide

GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse avec détection par ionisation de flamme

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectre de masse

TSB : « Tryptic Soy Broth »

Sommaire

Les traitements biologiques des sols, bien qu'avantageux sur le plan économique et écologique, sont parfois d'une efficacité limitée face à des sols pollués par des polluants de poids moléculaires élevés, dits lourds, et peu solubles comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ce travail porte sur l'étude de la biodégradation du chrysène, un HAP lourd modèle, et démontre qu'un sol contaminé aux hydrocarbures possède une population bactérienne capable de dégrader ce composé. La microflore d'une sablière contaminée aux hydrocarbures a été en mesure de dégrader, en microcosmes, plus de 90% du chrysène ajouté après 90 jours d'incubation. Une technique de culture, la culture biphasique, et un protocole d'analyse par chromatographie liquide de haute performance, ont été mis au point afin d'améliorer la performance de cette microflore et d'en faciliter l'étude. Cette méthode a permis d'effectuer la biodégradation, par la microflore indigène du sol contaminé, d'environ 90% du chrysène ajouté après 21 jours d'incubation. L'utilisation de cultures biphasiques a aussi permis l'isolement d'un consortium bactérien capable d'effectuer la biodégradation rapide et complète du chrysène en milieu à pH neutre. Ce consortium a conservé la capacité d'effectuer la biodégradation du phénanthrène et du pyrène, mais n'a pas été en mesure de dégrader des HAP ayant plus de quatre cycles aromatiques. La technique des cultures biphasiques s'est avérée être une excellente méthode pour augmenter grandement la biodisponibilité du chrysène, un des facteurs principaux de sa récalcitrance. Par contre, l'augmentation de la biodisponibilité à elle seule n'a pas permis la biodégradation de d'autres HAP lourds. Il semble que des facteurs spécifiques aux microorganismes jouent aussi un rôle important dans la biodégradation.

Introduction

La contamination des sols est une des conséquences importantes de l'industrialisation. Un sol contaminé contient des concentrations d'éléments toxiques et souvent récalcitrants qui réduisent sa valeur tant sur le plan écologique que sur le plan économique. Il existe plusieurs types de composés contaminants, naturels et xénobiotiques. Plusieurs d'entre eux sont régis par des normes gouvernementales spécifiques sur la concentration permise dans un sol, parce qu'ils présentent un potentiel de risque pour la santé publique et/ou pour l'environnement.

Les hydrocarbures sont parmi les contaminants les plus fréquemment retrouvés (Anonyme, 1988). En 1993, le Groupe d'étude et de restauration des sols contaminés, mis sur pied par le Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF), a répertorié plus de 800 sites contaminés au Québec. De plus, le Ministère des ressources naturelles du Québec a rapporté plus de 17 500 sites, principalement des stations-service, contenant des réservoirs enfouis qui laissent échapper des hydrocarbures (Samson, 1994a, 1994b). Bien que tous les réservoirs de stations-service seront remplacés avant 2001, un très grand nombre de ces sites sont fortement contaminés aux hydrocarbures. Aux États-Unis, plus de 50 000 sites contaminés et plusieurs centaines de milliers de réservoirs non étanches ont été répertoriés. (Singleton, 1994). L'immensité du problème devient rapidement apparente et des solutions pratiques et économiques de décontamination doivent être proposées pour permettre la réutilisation de ces sites.

Parmi les hydrocarbures réglementés retrouvés dans ces sites contaminés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont d'un intérêt particulier. Les HAP sont une famille de molécules caractérisées par une faible solubilité en milieu aqueux ainsi qu'une récalcitrance et une toxicité qui croient avec le poids moléculaire du composé (Cerniglia, 1993 ; Leahy et Colwell, 1990).

Il existe peu de traitements économiques et respectueux de l'environnement qui soient efficaces pour décontaminer les sols contenant des HAP. La biorémédiation est un type de traitement prometteur. Ce genre de traitement repose sur l'utilisation de microorganismes pouvant effectuer la biodégradation des composés toxiques présents dans un site contaminé. Plusieurs microorganismes capables de dégrader les HAP ont été identifiés dans la littérature (Cerniglia, 1993 et 1992). Il s'agit principalement de bactéries et de champignons retrouvés dans des sols déjà contaminés. Chez les bactéries, les genres *Pseudomonas* et *Sphingomonas* sont souvent mentionnés. Chez les champignons les genres *Cunninghamella* et *Phanerochaete* sont souvent retrouvés.

L'application de traitements biologiques à des sols contaminés aux HAP obtient pour le moment un succès limité. En effet, de tels traitements sont très efficaces pour dégrader les HAP ayant moins de 4 cycles aromatiques et peu efficaces pour les autres HAP. Ces molécules à plus de 3 noyaux aromatiques sont moins solubles, donc plus difficilement accessibles pour les microorganismes. En fait, relativement peu de microorganismes capables de dégrader les HAP plus lourds ont été isolés jusqu'à présent (Schneider *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1996 ; Ye *et al.*, 1996 ; Cerniglia, 1992). Il existe donc un intérêt d'isoler et d'étudier des ayant le potentiel de biodégrader ces HAP lourds dans le but de mettre sur pied des biotraitements plus efficaces.

Dans ce projet, nous nous intéressons au chrysène, un HAP à 4 cycles aromatiques caractérisé par sa très faible solubilité ainsi que par son potentiel cancérigène. Ce composé est un très bon exemple de HAP récalcitrant et très peu de bactéries (Ye *et al.*, 1996 ; Caldini *et al.*, 1995 ; Walter *et al.*, 1991) et de champignons (Kiehlmann *et al.*, 1996 ; Pothuluri *et al.*, 1995) pouvant le dégrader ont été isolés.

Un sol fortement contaminé aux HAP constitue une source idéale de bactéries ou de champignons pouvant dégrader le chrysène. L'utilisation de cultures en microcosmes,

cultures composées de sol contaminé sursaturé avec une phase liquide, permet de mettre en évidence la présence de microorganismes capables de dégrader les HAP (Lirette, 1996). La biodisponibilité limitée des HAP à plus de 3 cycles tel le chrysène est un des facteurs majeurs qui limitent la performance de dégradation des microcosmes. Pour pouvoir étudier la biodégradation du chrysène et isoler les microorganismes qui en sont responsables, il devient important de mettre au point de nouvelles méthodes de cultures qui visent à améliorer la biodisponibilité du chrysène.

Afin de développer une nouvelle approche pour augmenter la biodisponibilité du chrysène et faciliter l'étude des microorganismes capables de le dégrader, il fallait envisager des méthodes non-traditionnelles. Parmi les méthodes présentées dans la littérature, deux semblent être d'un intérêt particulier.

La première fut présentée par Caldini *et al* (1995). Elle consiste à augmenter la concentration du chrysène dissout dans des cultures liquides par l'ajout d'une petite quantité de solvant organique, l'acétonitrile, saturée de chrysène. La particularité de ce solvant est qu'il est miscible à l'eau, donc il se mélange à ce dernier pour former une solution homogène. Cette méthode permet donc d'augmenter significativement la quantité de chrysène dissout dans le milieu sans inhiber de façon drastique la croissance de certaines bactéries. Cette méthode a permis de démontrer une biodégradation significative du chrysène par des bactéries.

La deuxième méthode, l'utilisation de cultures biphasiques, présente des aspects très prometteurs (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993 ; Vanneck *et al.* 1995). Ce type de culture est caractérisé par la présence de deux phases liquides. La première, dite aqueuse, est composée d'un milieu de culture liquide minimal et contient les microorganismes. La deuxième, qui est hydrophobe, est composée d'une huile inerte qui permet la dissolution complète d'un composé récalcitrant à dégrader tel des chlorobenzènes ou autres composés

xénobiotiques. Ce type de culture permet d'augmenter l'accessibilité du composé aux microorganismes présents dans la phase aqueuse et ainsi en augmenter la biodisponibilité (Labare et Alexander, 1995 ; Jimenez et Bartha, 1996). Par un mécanisme encore peu connu, les microorganismes qui sont capables de dégrader le composé peuvent l'utiliser directement de la phase hydrophobe et s'en servir comme source de carbone pour supporter leur croissance.

À notre connaissance, l'utilisation de cultures biphasiques pour étudier la biodégradation du chrysène n'a pas encore été effectuée. En combinant ce type de culture avec les méthodes d'analyses de biodégradation traditionnelles telles l'extraction de HAP par des solvants organiques et la quantification par chromatographie, nous avons développé et mis au point d'une procédure efficace et rapide pour suivre la biodégradation du chrysène. Cette procédure devrait aussi faciliter l'isolement et l'étude des microorganismes qui peuvent dégrader les HAP lourds tels le chrysène.

Les travaux de recherches présentés ici ont comme objectifs de démontrer qu'un sol fortement contaminé avec certains hydrocarbures contient des microorganismes capables de dégrader un HAP récalcitrant comme le chrysène, d'isoler ces microorganismes et de les étudier pour mieux comprendre les mécanismes de cette dégradation. Nous tenterons, dans un premier temps, de démontrer la dégradation du chrysène à l'aide de cultures en microcosmes en utilisant un sol provenant d'une sablière contaminée aux hydrocarbures lourds. En plus, des cultures liquides contenant des HAP,ensemencées avec une suspension de microorganismes indigènes isolés de la sablière contaminée, seront utilisées afin d'étudier la biodégradation du chrysène dans un milieu dont la matrice physico-chimique est simplifiée par rapport aux microcosmes.

Pour augmenter la biodisponibilité du chrysène et ainsi accélérer sa vitesse de dégradation, les cultures en milieu liquide seront modifiées. Des cultures liquides

contenant de faibles concentrations d'une solution d'acétonitrile saturée de chrysène et des cultures biphasiques composés d'un milieu liquide et d'une phase d'huile de silicone contenant du chrysène seront utilisées. Ces deux types de cultures seront inoculés avec une suspension de microorganismes provenant d'un sol québécois fortement contaminé aux hydrocarbures. Les cultures additionnées d'acétonitrile et les cultures biphasiques seront testées pour leur efficacité à dégrader le chrysène. Une méthode de quantification du chrysène par chromatographie liquide de haute performance sera développée et appliquée aux analyses de ces cultures.

Des enrichissements continuels en cultures biphasiques seront effectués afin d'établir une culture de maintien capable de dégrader efficacement le chrysène. L'isolement d'un consortium bactérien enrichi capable de dégrader rapidement le chrysène se fera à partir de plusieurs séries de repiquages et de dilutions des cultures de maintien. Ce consortium isolé sera caractérisé.

En parallèle, des cultures similaires (microcosmes, liquides et biphasiques) seront utilisées pour vérifier si des champignons indigènes de la sablière contaminée peuvent dégrader certains HAP dont le chrysène.

L'objectif suivant sera de démontrer si des souches bactériennes de collection, isolées lors de travaux antérieurs, peuvent dégrader le chrysène en cultures biphasiques. Ces souches sont reconnues pour dégrader des HAP plus légers en culture liquide mais aucune d'elles n'a démontré une dégradation du chrysène dans ces conditions. Il devient intéressant d'étudier à nouveau le potentiel de ces souches dans des cultures biphasiques qui permettent d'augmenter la biodisponibilité du chrysène.

Comme autre objectif, les cinétiques de dégradation de divers HAP, dont le chrysène, par le consortium isolé et les souches de collection seront déterminées. Différents aspects seront aussi étudiés, tels le dénombrement des souches lors de la dégradation, la minéralisation du chrysène en milieu biphasique, l'effet des variations du pH du milieu sur la biodégradation et le spectre de dégradation des HAP.

Revue de littérature

1. LES SOLS CONTAMINÉS

1.1 Les contaminants

Plusieurs substances synthétisées par l'être humain sont potentiellement toxiques et s'accumulent dans l'environnement. Cette accumulation de substances en concentrations bien supérieures à celles retrouvées naturellement peut poser de sérieux problèmes au niveau écologique et économique (Singleton, 1994). Les sols sont particulièrement affectés par la contamination. La production et le déversement de déchets industriels, l'exploitation pétrolière ainsi que l'industrie des pâtes et papiers sont d'importantes causes de la pollution des sols et des réserves d'eau souterraine qui s'y trouvent. L'agriculture aussi joue un rôle significatif dans la contamination des sols par l'utilisation de pesticides et l'épandage d'engrais chimiques (Beaulieu et Drouin, 1998 ; Anonyme 1988). Les sols contaminés peuvent contenir d'importantes concentrations de substances toxiques telles que des métaux lourds, des hydrocarbures, des composés aromatiques volatils (benzène, toluène, etc.) ainsi que des composés phénolés et chlorés tels le pentachlorophénol et les biphénylpolychlorés (Samson, 1994a).

1.2 Les sols contaminés au Québec.

Le nombre de sols contaminés en Amérique du Nord est considérable. En 1994, aux États-Unis, plus de 50 000 sites considérés comme étant officiellement contaminés ont été répertoriés (Singleton, 1994). Au Canada, le nombre de sites contaminés est estimé à plus de 100 000 (Calder, 1997). Seulement au Québec, d'après la banque de données du MEF mise à jour en mai 1996, il y aurait 1870 sites contaminés. De ceux-ci, 112 sont contaminés par des HAP à une concentration supérieure au critère C. Ces chiffres font abstraction des multiples réservoirs d'hydrocarbures enfouis qui, dû à la corrosion, laissent leur contenus s'échapper dans les sols. En fait, sur les quelques 50 000 réservoirs présents sous le sol québécois, le ministère des ressources naturelles a estimé, en 1992 à plus de 17 000 le nombre de réservoirs qui laissent échapper des hydrocarbures (Samson, 1994a). Aux États-Unis, ce problème est décuplé car le nombre de réservoirs endommagés qui contaminent les sols dans lesquels ceux-ci sont enfouis est estimé à plusieurs centaines de milliers (Singleton, 1994). Bien que les instances gouvernementales

du Québec aient exigé que tous les réservoirs souterrains soient remplacés avant 2001, la majorité de ces sites sont déjà considérés comme contaminés (Samson, 1994b). Même dans le Grand Nord québécois, des cas de sols contaminés aux hydrocarbures ont été rapportés (Anonyme 1990).

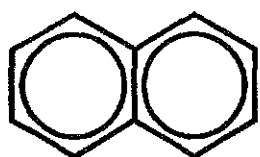
2. LES HYDROCARBURES.

2.1 Les classes d'hydrocarbures

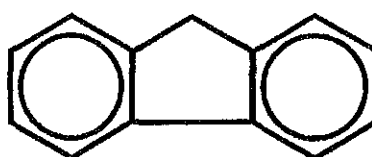
Comme ces derniers chiffres en témoignent, la contamination par les hydrocarbures est une des causes principales de la contamination des sols. Il existe quatre familles d'hydrocarbures : les aliphatiques, les aromatiques, les asphaltènes et les résines (Leahy et Colwell, 1990 ; Walker et Colwell, 1976). Les aliphatiques sont composés de longues chaînes carbonées, saturées ou non par l'hydrogène. Ces chaînes peuvent être linéaires, ramifiées ou cycliques. Les aliphatiques sont, en général, les hydrocarbures les plus volatils et les plus facilement oxydés par les microorganismes (Leahy et Colwell, 1990 ; Atlas, 1981).

Les hydrocarbures aromatiques sont agencés en un ou plusieurs noyaux cycliques dont le plus simple est le benzène. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont composés de deux ou plusieurs noyaux benzéniques regroupés de façon linéaire, angulaire ou en amas (Figure 1) (Cerniglia, 1993 ; Cerniglia, 1992 ; Wilson et Jones, 1993). Leur récalcitrance dans les sols augmentent avec leur poids moléculaire (Cerniglia, 1984).

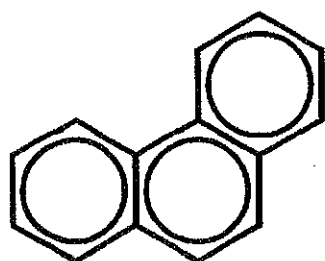
Les asphaltènes et les résines sont tous deux des hydrocarbures de haut poids moléculaire. Ils regroupent, entre autres, des acides carboxyliques, des acides gras, des porphyrines, des pyridines, des sulfoxydes et des amides. Ils sont considérés comme très récalcitrants à plusieurs types de traitement. (Walker et Colwell, 1976).



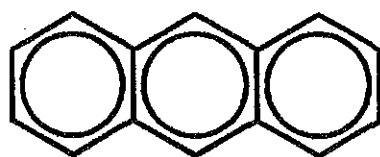
Naphtalène



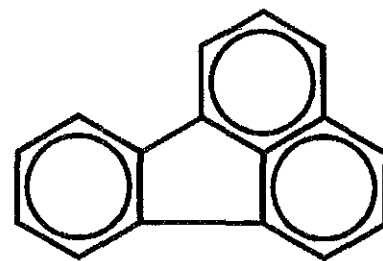
Fluorène



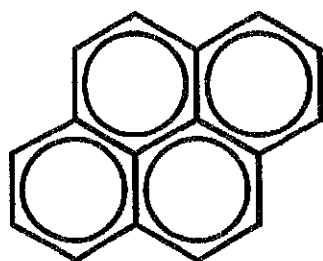
Phénanthrène



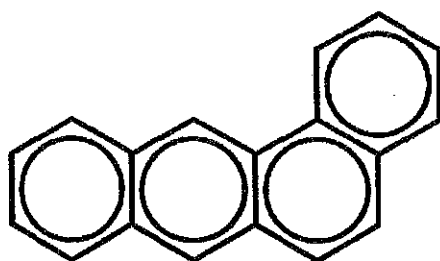
Anthracène



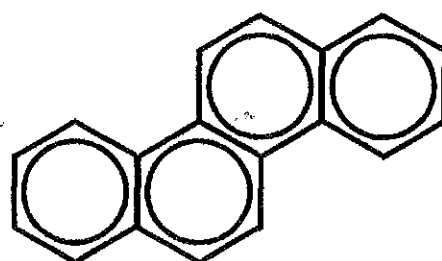
Fluoranthène



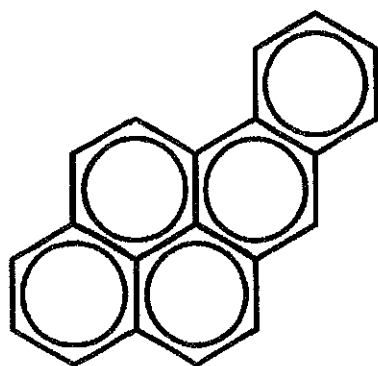
Pyrène



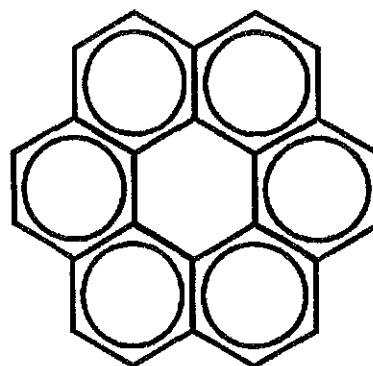
Benz(a)anthracène



Chrysène



Benzo(a)pyrène



Coronène

Figure 1. Structures chimiques de quelques HAP (Wilson et Jones, 1993).

2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

2.2.1 Généralités

Les HAP sont retrouvés dans la majorité des sols contaminés aux hydrocarbures (Samson, 1994a ; Cerniglia, 1993). Ils sont formés principalement lors de la combustion de la matière organique (Cerniglia, 1984). Ils se retrouvent dans l'environnement suite à des rejets industriels tels que les effluents des industries pétrolières, pétrochimiques et des papetières. Les émissions des moteurs, l'incinération des déchets, l'utilisation de l'huile de créosote dans le traitement du bois et toutes les activités reliées aux produits pétroliers, dont les déversements accidentels, sont des exemples de sources de HAP qui causent leur accumulation dans l'environnement (Cerniglia, 1992 ; Wilson et Jones, 1993 ; Leahy et Colwell, 1990 ; Laflamme et Hites, 1978).

Les HAP sont des composés chimiquement stables ayant tendance à s'accumuler dans les sols. Cette persistance dans les sols est principalement due à leur faible solubilité dans l'eau. Une fois retrouvés dans les sols, certains HAP peuvent être volatilisés, d'autres oxydés chimiquement ou par la lumière, bioaccumulés, entraînés dans la nappe phréatique ou dégradés par la microflore du sol (Cerniglia, 1992). Les HAP de haut poids moléculaire, c'est-à-dire à 4 cycles aromatiques et plus, sont moins susceptibles d'être enlevés des sols par ces moyens. De plus, ils ont plutôt tendance à s'adsorber aux particules du sol et deviennent alors très difficiles à déloger (Mihelcic *et al.* , 1993 ; Means *et al.* , 1980, Hites *et al.* , 1977).

Plusieurs HAP sont toxiques et posent un risque significatif pour les habitants des régions industrialisées (Thakker *et al.* , 1985). Par leur structure lipophile et leur génotoxicité, certains HAP sont considérés comme d'importants cancérigènes (Cerniglia, 1992). Cette toxicité des HAP augmente aussi avec le poids moléculaire de la molécule, particulièrement pour ceux ayant plus de 4 cycles aromatiques (Jacob *et al.* , 1986 ; Miller et Miller, 1981).

2.2.2 Les normes

Parce que les HAP sont récalcitrants dans les sols et potentiellement cancérigènes, les gouvernements canadiens et américains ont tous deux placés cette famille de composés sur leur liste de polluants prioritaires, soit dans « The Canadian Environmental Protection Act » et au « U.S. Environmental Protection Agency » (Meek *et al.* , 1994 ; Keith et Telliard, 1979). Au Québec, le MEF a mis sur pied une liste de normes pour différents polluants tels les métaux lourds, les composés chlorés et phénolés ainsi que les hydrocarbures dont les HAP. Ces normes régissent les quantités tolérées des différents contaminants dans les sols selon l'utilisation des terrains affectés. Elles sont en réalité des critères indicatifs et sont exprimés en concentrations de contaminants dans les sols. Ces critères permettent la classification des sites qui est basée sur des valeurs-seuils de concentrations séparées selon les lettres A, B et C, où C est la valeur supérieure. L'intervalle entre 2 seuils est considéré comme une plage d'intervention, donc il existe 3 plages soit : A-B, B-C et au-dessus de C (Anonyme, 1988).

Des critères de concentrations ont été donnés pour certains des HAP. Le Tableau 1 montre les concentrations A, B et C de ces composés. Le seuil A correspond à une concentration de moins de 0.1 mg de HAP par kg de sol. Les concentrations qui correspondent au seuil C, le plus élevé, atteignent entre 10 et 100 ppm selon les composés. La plage d'intervention A-B englobe les sols faiblement contaminés et aucune intervention de décontamination n'est exigée. Ces sols peuvent servir de terrains résidentiels. Les sols inclus dans la plage B-C sont considérés comme étant moyennement contaminés et doivent être traités s'ils peuvent avoir un impact négatif sur la nappe phréatique. Ces sols peuvent servir à des fins industrielles ou commerciales. La plage C inclut les sols fortement contaminés. Tout usage de ces sols est restreint. Des travaux de décontaminations doivent être entrepris pour ramener ces sols à une plage inférieure avant toute exploitation industrielle, commerciale ou résidentielle (Beaulieu et Drouin, 1998).

Tableau 1 : Critères indicatifs de la contamination des sols par les HAP

HAP	Concentration (mg/Kg) de matière sèche		
	A	B	C
Acénaphthalène	<0,1	10	100
Acénaphthylène	<0,1	10	100
Anthracène	<0,1	10	100
Fluoranthène	<0,1	10	100
Fluorène	<0,1	10	100
Pyrène	<0,1	10	100
Naphtalène	<0,1	5	50
Phénanthrène	<0,1	5	50
Chrysène	<0,1	1	10
Benzo(a)anthracène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,h)anthracène	<0,1	1	10
3-méthylclorathène	<0,1	1	10
Benzo(b)fluoranthène	<0,1	1	10
Benzo(j)fluoranthène	<0,1	1	10
Benzo(k)fluoranthène	<0,1	1	10
Benzo(g,h,i)pérylène	<0,1	1	10
Benzo(a)pyrène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,h)pyrène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,i)pyrène	<0,1	1	10
Dibenzo(a,l)pyrène	<0,1	1	10
Indéno(1,2,3,c,d)pyrène	<0,1	1	10

(Anonyme, 1988)

3. TRAITEMENTS DES SOLS

3.1 Généralités

Il existe plusieurs types de méthodes de décontamination des sols que l'on peut séparer en 3 classes : les procédés thermiques, les procédés physico-chimiques et les procédés biologiques. Les procédés thermiques détruisent ou séparent les contaminants du sol par combustion, pyrolyse ou désorption thermique. Cette méthode implique l'utilisation, par exemple, de fours à ciment rotatif, de lits fluidisés, de fours à plasma, de pyrolyseurs ou de fours catalytiques et oxydatifs. Les procédés physico-chimiques, quant à eux, traitent les contaminants de deux façons. La première catégorie de traitement consiste à détruire ou neutraliser les contaminants par des procédés comme la photolyse, l'oxydoréduction, la déhalogénéation ou l'ozonation. La deuxième catégorie tente de récupérer ou concentrer les contaminants par des extractions, des séparations physiques, des filtrations, des précipitations ou des solidifications (Samson, 1994a). Les procédés biologiques tentent d'exploiter les systèmes enzymatiques de certains microorganismes pour éliminer les contaminants. Le Tableau 2 montre une distribution des divers procédés utilisés pour le traitement dans 535 sites aux États Unis (Berkowitz et Farkas, 1992). Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés aux procédés biologiques appliqués aux traitements des sols contaminés aux HAP.

3.2 Procédés biologiques

Les procédés biologiques de décontamination des sols reposent sur la dégradation des composés polluants par des microorganismes. Une large gamme de composés organiques toxiques récalcitrants peuvent servir de sources de carbone à un nombre constamment grandissant de microorganismes (Singleton, 1994). Ceci a eu pour effet d'augmenter l'intérêt d'utiliser de tels procédés, aussi appelés biorémédiation, pour décontaminer des sols. Ces méthodes utilisent les procédés naturels par lesquels les microorganismes dégradent certaines molécules organiques lors de leurs activités métaboliques (Atlas et Cerniglia, 1995). Généralement, la biorémédiation d'un sol s'effectue en accélérant les processus de biodégradation naturels en procurant aux

Tableau 2 : Distribution des méthodes de décontamination dans 535 sites aux États-Unis

Technologie favorisée	Pourcentage (%)
Procédés thermiques	
- Incinération sur le site	11
- Incinération hors site	10
- Vitrification <i>in-situ</i>	1
- Désorption thermique	3
Procédés physico-chimiques	
- Solidification/stabilisation	16
- Extraction des composés volatils	9
- Lavage des sols	5
- Traitement chimique	3
- Extraction par solvant	1
Procédés biologiques	6
Solutions temporaires	
- Encapsulation / mise en décharge	35
Total	100

(Berkowitz et Farkas, 1992)

microorganismes un environnement favorable à leur croissance (Samson, 1994a). Ces procédés permettent donc d'éliminer de façon permanente les polluants en les transformant en composés moins toxiques ou en effectuant une minéralisation complète. Dans le cas d'une minéralisation, le contaminant est dégradé en composés simples comme le CO₂ et le H₂O lors d'une biodégradation aérobie et en composés comme le CH₄ et le CO₂ lors d'une biodégradation anaérobie (Providenti *et al.*, 1993 ; Morgan et Watkinson, 1989).

Les procédés biologiques peuvent s'appliquer de deux façons : des traitements *in-situ* ou *ex-situ*. Les technologies *in-situ* sont appliquées sur le sol en place, directement sur les sites contaminés. Ceci est nécessaire lorsqu'il est impossible d'excaver le sol contaminé pour effectuer le traitement ailleurs ou lorsqu'il y a un risque de contaminer la nappe phréatique d'un site. La biorémédiation peut être effectuée par les microorganismes indigènes dont le développement est optimisé par le contrôle de divers paramètres tels l'oxygénation, l'humidité et l'ajout d'oligo-éléments favorisant la croissance de la microflore. Des microorganismes peuvent aussi êtreensemencés dans un sol contaminé si la microflore indigène ne possède pas les enzymes nécessaires à la biodégradation des polluants (Samson, 1994b). Les procédés *ex-situ* sont utilisés lorsque l'on peut excaver les sols contaminés et effectuer le traitement sur le site ou ailleurs. Ceci permet le traitement de larges volumes de sols dans des environnements contrôlés. Il existe 5 types de traitements *ex-situ*, soit l'épandage contrôlé, la bioventilation, les bioréacteurs de type «slurry», les bioréacteurs à sol statique et les traitements en biopiles. Toutes ces méthodes tentent de procurer les meilleures conditions environnementales possibles afin d'effectuer la biodégradation des contaminants présents dans les sols excavés (Samson, 1994a).

Les procédés biologiques ont gagné en popularité grâce aux travaux de recherches qui ont mis en évidence de nouveaux microorganismes dégradant de plus en plus de composés organiques différents. Ces recherches ont aussi entraîné le développement de nouvelles méthodes permettant d'optimiser les procédés de biodégradation déjà connus. Au Québec, la nouvelle politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés favorise des stratégies qui réduisent les risques de façon permanente (Anonyme

1990 ; Beaulieu et Drouin 1998). Cette politique encourage la mise sur pied de biotraitements comme stratégie d'intervention dans la réhabilitation de sites contaminés.

3.3 Procédés biologiques vs autres types de traitements

La biorémédiation présente certains avantages face aux autres types de traitements des sols. Les traitements thermiques, bien qu'étant rapides et hautement efficaces dans l'élimination des contaminants, sont très coûteux et énergivores. De plus, l'incinération d'un sol lui enlève toute valeur étant donné qu'il devient inutilisable tant pour l'agriculture que pour l'établissement d'un nouvel écosystème. Les procédés physico-chimiques, quant à eux, sont plus respectueux pour l'environnement et jouissent d'une souplesse et d'une efficacité reconnue. Par contre, certaines applications comme l'extraction par solvant, peut avoir des impacts négatifs sur l'environnement. De plus, ces méthodes requièrent d'importants apports énergétiques et des infrastructures relativement complexes (Samson, 1994a). Finalement, les procédés physico-chimiques ne sont généralement efficaces que pour les régions supérieures des sols contaminés étant donné que des excavations sont habituellement nécessaires (Morgan et Watkinson, 1989). Les procédés biologiques se présentent comme étant une alternative beaucoup plus économique et plus respectueuse de l'environnement que les deux autres. Aussi, ces procédés biologiques entraînent l'élimination des polluants et non simplement leur déplacement comme dans certains autres procédés. Le travail d'élimination étant fait par des microorganismes, il y a économie sur les substances chimiques et les infrastructures utilisées pour effectuer le même travail physico-chimique. Une fois le traitement terminé, le sol ayant subi une biorémédiation retrouve sa valeur économique et écologique originale.

Par contre, bien que de nouvelles biotechnologies applicables aux traitements des sols soient développées constamment, la biorémédiation n'est pas encore considérée comme aussi efficace que les deux autres types de méthodes au point de vue de l'élimination complète des contaminants. Bien que plusieurs traitements aient été effectués avec une grande efficacité, certaines contraintes demeurent. La complexité des mélanges de polluants, la composition des sols, l'apport de nutriments aux microorganismes du site,

la survie des microorganismes dans les sites, l'adsorption de certains contaminants aux particules de sol et la faible biodisponibilité de certains contaminants tels les HAP lourds peuvent limiter l'efficacité du biotraitement (Bouchez *et al.*, 1996 ; Kästner et Mahro, 1996 ; Venosa *et al.*, 1996 ; Zhou et Crawford, 1995 ; Parker et Monteith, 1995 ; Morgan et Watkinson, 1992).

4. MICROORGANISMES

4.1 Dégradant les hydrocarbures

Les méthodes de biorémédiation sont toutes basées sur les capacités des microorganismes indigènes aux sols à utiliser les contaminants comme source de carbone. D'un point de vue chimique, les hydrocarbures sont d'excellentes sources de carbones concentrés. Dès 1946, des travaux ont montré que plusieurs microorganismes, couramment répandus dans notre environnement, avaient la capacité d'utiliser les hydrocarbures comme unique source de carbone (ZoBell, 1946). Cette capacité avait dès lors été reliée à la nature chimiques des hydrocarbures ainsi qu'aux facteurs environnementaux affectant les microorganismes.

La composition de la microflore d'un sol affecte directement le succès d'un traitement biologique. La proportion des microorganismes hydrocarbonoclastes varie d'un sol à l'autre. Cette variation découle de facteurs tels les propriétés physico-chimiques du site (humidité, oxygénation, proportion d'oligo-éléments, etc.) et les sources de carbones disponibles (Morgan et Watkinson, 1992). Les bactéries, les cyanobactéries, les champignons et les algues sont tous impliqués dans la dégradation des hydrocarbures dans les sols et les environnements aquatiques. Cependant, les bactéries constituent les principaux microorganismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures, suivi des champignons (Atlas et Cerniglia, 1995, Leahy et Colwell, 1990). Bien que les champignons semblent être plus aptes à supporter les conditions extrêmes de pH, de carences en eau et en nutriments d'un sol, les bactéries, en conditions neutres, sont plus favorisées par la présence d'hydrocarbures dans leur milieu (Morgan et Watkinson, 1989).

La proportion et la diversité des microorganismes pouvant dégrader les hydrocarbures dans la flore indigène peuvent se retrouver fortement augmentées suite à la contamination d'un sol par des hydrocarbures. Plusieurs études ont montré la capacité que possède la flore indigène de s'adapter à un site contaminé et d'augmenter son activité de biodégradation des hydrocarbures (Carman *et al.*, 1996 ; Braddock *et al.*, 1995 ; Leahy et Colwell, 1990). La proportion de microorganismes indigènes capable de dégrader les hydrocarbures est donc généralement liée au degré de contamination du site.

Un très grand nombre de microorganismes (bactéries et champignons) capables de dégrader les hydrocarbures a été répertorié. Chez les bactéries, les principaux genres sont : *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Arthrobacter* et autres coryneformes, *Vibrio*, *Bacillus*, *Micrococcus* et *Acinetobacter*. D'autres genres bactériens hydrocarbonoclastes sont aussi retrouvés : *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leucothrix*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Peptococcus*, *Sarcina*, *Spaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces* et *Xanthomonas*. Les champignons filamenteux hydrocarbonoclastes les plus répandus sont : *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. Les autres genres sont : *Allescheria*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cunninghamella*, *Debaromyces*, *Fusarium*, *Gonytrichum*, *Hansenula*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Oidiodendrum*, *Paeilomyces*, *Phanerochaetes*, *Phialophora*, *Rhodosporidium*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Scopulariopsis*, *Torulopsis*, *Thricoderma* et *Trichosporon* (Atlas et Cerniglia, 1995).

4.2 Dégradant les HAP

Par leurs structures cycliques qui les rendent chimiquement stables, les HAP sont plus difficilement dégradés par les microorganismes que les hydrocarbures aliphatiques. Il existe plusieurs microorganismes capables de dégrader des HAP mais le taux de dégradation est généralement inversement proportionnel à la taille de la molécule (Atlas et Cerniglia, 1995). Les HAP légers (3 cycles aromatiques et moins) sont souvent volatilisés ou dégradés sous forme dissoute. Les HAP plus lourds (4 cycles et plus) ne se volatilisent pratiquement pas et sont relativement plus récalcitrants aux attaques enzymatiques.

Plusieurs genres bactériens ayant la capacité de dégrader les HAP légers tels que le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène et le fluoranthène sont présents dans le Tableau 3.

Parmi les HAP plus lourds et plus récalcitrants, un moins grand nombres de microorganismes capables d'effectuer leur biodégradation ont été isolés (Li *et al.* , 1996 ; Schneider *et al.* , 1996 ; Ye *et al.* , 1996 ; Bouchez *et al.* , 1995 ; Pothuluri *et al.* , 1995 ; Tiehm et Fritzche, 1995 ; Boldrin *et al.* , 1993 ; Heitkamp *et al.* , 1988a et 1988b). Par contre, chez les champignons, un plus grand nombre d'espèces capables d'oxyder le benzo(a)pyrène a été répertorié. Relativement peu d'informations sur les bactéries pouvant dégrader les HAP lourds tel le chrysène ont été publiées (Kiehlmann *et al.* , 1996 ; Ye *et al.* , 1996 ; Caldini *et al.* , 1995 ; Walter *et al.* , 1991).

4.2.1 Bactéries

Plusieurs bactéries provenant des sols ont la capacité d'utiliser certains HAP comme source de carbone. Parmi elles, les genres bactériens *Pseudomonas*, *Mycobacterium* et *Sphingomonas* comptent les plus grands nombres d'espèces répertoriés (Bouchez *et al.* , 1996 ; Schneider *et al.* , 1996 ; Shuttleworth et Cerniglia, 1996 ; Ye *et al.* , 1996 ; Caldini *et al.* , 1995 ; Providenti *et al.* , 1995a ; Stringfellow et Aitken, 1995 ; Tiehm et Fritzsche, 1995 ; Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995 ; Boldrin *et al.* , 1993 ; Cerniglia, 1992). La majorité de ces souches peuvent utiliser, en cultures pures, les HAP ayant 3 cycles aromatiques ou moins ainsi que le pyrène, un HAP à quatre cycles. Par contre, peu d'entre elles ont été en mesure d'effectuer une biodégradation significative de HAP plus lourds tels le chrysène et le benzo(a)pyrène (Schneider *et al.* , 1996 ; Ye *et al.* , 1996 ; Caldini *et al.* , 1995 ; Cerniglia, 1992).

Tableau 3 : Genres bactériens et de champignons pouvant oxyder les HAP

Composés	Bactéries	Champignons
HAP Légers		
- Naphtalène	<i>Acinetobacter, Alcaligenes, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhodococcus, Corynebacterium, Moraxella, Streptomyces, Bacillus, Sphingomonas</i>	<i>Absidia, Aspergillus, Basidiobolus, Candida, Choanephora, Circinella, Claviceps, Cokeromyces, Conidiobolus, Cunninghamella, Emericellopsis, Epicoccum, Gilbertella, Gilocladium, Helicostylum, hyphochytrium, Linderina, Mucor, Neurospora, Panaeolus, Penicillium, Pestalotia, Phlyctochytrium, Phycomyces, Phytophthora, Psilocybes, Rhizophlyctis, Rhizopus, Saccharomyces, Saprolegnio, Smittium, Sordaria, Syncephalastrum, Thamnidium, Zygorhynchus,</i>
- Anthracène	<i>Beijerinckia, Pseudomonas, Rhodococcus, Flavobacterium, Arthrobacter.</i>	<i>Bjerkandera, Cunninghamella, Phanerochaete, Ramaria, Rhizoctonia, trames</i>
- Phénanthrène	<i>Aeromonas, Alcaligenes, Arthrobacter, Beijerinckia, Micrococcus, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhodococcus, Vibrio, Nocardia, Flavobacterium, Streptomyces, Arthrobacter, Acidovorax, Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella, Phanerochaete, Trametes</i>
- Fluoranthène	<i>Alcaligenes, Mycobacterium, Pseudomonas, Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella</i>
HAP Lourds		
- Pyrène	<i>Alcaligenes, Mycobacterium, Rhodococcus, Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella, Phanerochaete</i>
- Chrysène	<i>Rhodococcus, Sphingomonas, Pseudomonas</i>	<i>Cunninghamella, Penicillium, Syncephalastrum</i>
-Benzo(a)pyrène	<i>Beijerinckia, Mycobacterium, Sphingomonas</i>	<i>Aspergillus, Bjerkandera, Candida, Chrysosporium, Cunninghamella, Mortiella, Neurospora, Penicillium, Phanerochaete, Ramaria, Saccharomyces, Syncephalastrum, Trametes, Trichoderma</i>

(Kiehlmann *et al*, 1997; Shuttleworth et Cerniglia, 1996 ; Ye *et al*, 1996 ; Caldini *et al*, 1995 ; Pothuluri *et al*,; Boldrin *et al*, 1993 ; Providenti *et al*, 1995 ; Stringfellow et Aitken, 1995 ; Tiehm et Fritzsche, 1995 ; Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995 ; Boldrin *et al*, 1993 ; Cernigila, 1992 ; Mueller *et al*, 1990 ; Weissenfels *et al*, 1990)

La majorité des études sur la biodégradation des HAP par les bactéries ont été effectuées en suivant la dégradation d'un seul HAP par une seule souche pour limiter le nombre de variables impliquées. Bien que ces études aient permis d'isoler des souches capables de dégrader les HAP et d'établir certaines voies métaboliques, elles n'ont pas contribué à expliquer les interactions entre les différents microorganismes agissant sur un mélange complexe de HAP telles que retrouvées dans un sol contaminé.

Afin de mieux comprendre les phénomènes en sols contaminés, certaines recherches ont porté sur la biodégradation des HAP, par des bactéries, en milieu plus complexe. En présence de plus d'un HAP, la dégradation par des bactéries a été obtenue, mais une compétition métabolique a souvent été observée (Bouchez *et al.*, 1995 ; Boldrin *et al.*, 1993 ; Weissenfels *et al.* 1990). Ce phénomène, observé chez des souches de *Pseudomonas* et de *Mycobacterium*, semble assez commun dans les sols (Tiehm et Fritzsche, 1995 ; Stringfellow et Aitken, 1994). Des dégradations simultanées de HAP ont été observées dans ces études mais elles s'effectuaient selon des taux de dégradation plus lents par rapport aux HAP étudiés individuellement. Dans certains cas, la présence de certains HAP peut ralentir ou inhiber la dégradation des autres (Bouchez *et al.*, 1995 ; Stringfellow et Aitken, 1995 ; Tiehm et Fritzsche, 1995). Par exemple, la présence de naphthalène dans un milieu de culture pouvait inhiber la biodégradation du phénanthrène par une souche reconnue pour sa capacité de dégrader ce dernier (Shuttleworth et Cerniglia, 1996). Dans une autre étude, une souche de *Sphingomonas paucimobilis* reconnue pour pouvoir minéraliser le benzo(a)pyrène, a été inhibée par la présence de benzo(b)fluoranthène sans pour autant être gênée par la présence de benzo(a)anthracène, de chrysène, de fluoranthène ou de dibenzo(a,h)anthracène (Ye *et al.*, 1996).

Bien que plusieurs bactéries hydrocarbonoclastes soient retrouvées dans un sol contaminé, relativement peu d'études sur l'interaction de plusieurs souches bactériennes connues sur la biodégradation d'un ou plusieurs HAP ont été effectuées (Ellis *et al.*, 1991 ; Mueller *et al.*, 1989). Parmi les effets observés, la présence de plus d'une souche active permet d'atténuer les effets inhibiteurs ou toxiques de certains HAP (Bouchez *et al.*,

1995). L'interaction des systèmes enzymatiques de plusieurs souches actives augmente le taux de biodégradation des HAP et permet d'effectuer la biodégradation de HAP plus récalcitrants qui résistent à l'activité d'une seule souche (Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995).

4.2.2 Champignons

Les études sur la biodégradation des champignons ont démontré que ceux-ci n'utilisent généralement pas les HAP comme source de carbone et d'énergie mais transforment plutôt les HAP de façon non spécifique en composés chimiques moins toxiques (Cerniglia, 1993). Plusieurs champignons pouvant oxyder les HAP en métabolites tels des dihydrodiols et des phénols ont été isolés (Kiehlmann *et al.*, 1996 ; Launen *et al.*, 1995 ; Pothuluri *et al.*, 1995 ; Cerniglia, 1992). Parmi ces champignons, certaines espèces font l'objet de plusieurs recherches. *Cunninghamella elegans*, un champignon filamenteux non ligninolytique, oxyde certains HAP cancérigènes, tels le chrysène et le benzo(a)pyrène en métabolites moins toxiques (Pothuluri *et al.*, 1995 ; Cerniglia, 1993). Trois souches de *Penicillium* ainsi qu'une souche de *Syncephalastrum racemosum*, capables d'oxyder le pyrène et le benzo(a)pyrène ont aussi démontré une capacité d'oxyder le chrysène (Kiehlmann *et al.*, 1996 ; Launen *et al.*, 1995). Par contre, le champignon *Phanerochaete chrysosporium*, mieux connu sous l'appellation anglaise «White-rot fungus», possède plusieurs enzymes (des peroxydases) qui s'attaquent à la matière ligno-cellulosique. Ce système enzymatique démontre une grande non-spécificité qui lui permet d'oxyder une gamme de composés aromatiques comme les HAP (Paszczynski et Crawford, 1995). C'est l'une des rares espèces qui peut dégrader complètement certains HAP comme le fluorène, le phénanthrène et même le benzo(a)pyrène en CO₂ par l'entremise de ses enzymes ligninolytiques. Cette minéralisation n'est pas toujours complète car il produit aussi beaucoup d'intermédiaires de dégradation (Sanglard *et al.*, 1986).

Bien que relativement peu documentés, les systèmes enzymatiques des champignons semblent agir de façon moins spécifique que chez les bactéries. Le co-métabolisme des HAP par ces enzymes non-spécifiques est courant. Le rôle des

champignons dans la biodégradation des HAP dans les sols pourrait être aussi important que celui des bactéries en transformant les HAP lourds en molécules moins toxiques et plus biodisponibles pour les autres microorganismes (Atlas et Cerniglia, 1995)

5. VOIES MÉTABOLIQUES

5.1 Bactéries

La biodégradation des HAP par les bactéries a été principalement étudiée en conditions aérobies. L'oxygène, le principal accepteur d'électron chez la bactérie, est aussi incorporé aux cycles aromatiques lors de leur oxydation. La biodégradation des HAP sous conditions anaérobies a aussi été observée et attire de plus en plus l'attention car bon nombre de sites contaminés sont insuffisamment oxygénés et les processus aérobies y sont inhibés (Leahy et Colwell, 1990). Dans ces cas, les accepteurs d'électron peuvent être, entre autres, des nitrates ou des sulfates (Coates *et al.*, 1996 ; Leduc *et al.*, 1992 ; Al-Bashir *et al.*, 1990 ; Mihelcic et Luthy, 1988a et 1988b). La revue de littérature portera strictement sur la biodégradation des HAP sous conditions aérobies car notre étude a été effectuée sous ces conditions.

L'initiation de la biodégradation des HAP par des bactéries s'effectue par une attaque enzymatique, en présence d'oxygène, sur un cycle aromatique (Cerniglia, 1992). L'enzyme, une dioxygénase, insère deux atomes d'oxygène moléculaire sur le cycle pour former un cis-dihydrodiol (Figure 2). Une déhydrogénase enlève les deux hydrogènes pour transformer le cycle en catéchol. Une autre dioxygénase effectue l'ouverture du cycle, soit en position *ortho* pour créer un acide cis-cis-muconique ou en position *méta* pour créer un 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde. Une fois ouverte, la molécule est oxydée de façon similaire aux hydrocarbures aliphatiques jusqu'à ce le cycle soit complètement dégradé et que l'attaque du prochain cycle aromatique soit initiée (Cerniglia, 1993). En utilisant un tel système enzymatique, un bon nombre de bactéries peuvent oxyder un large éventail de composés aromatiques.

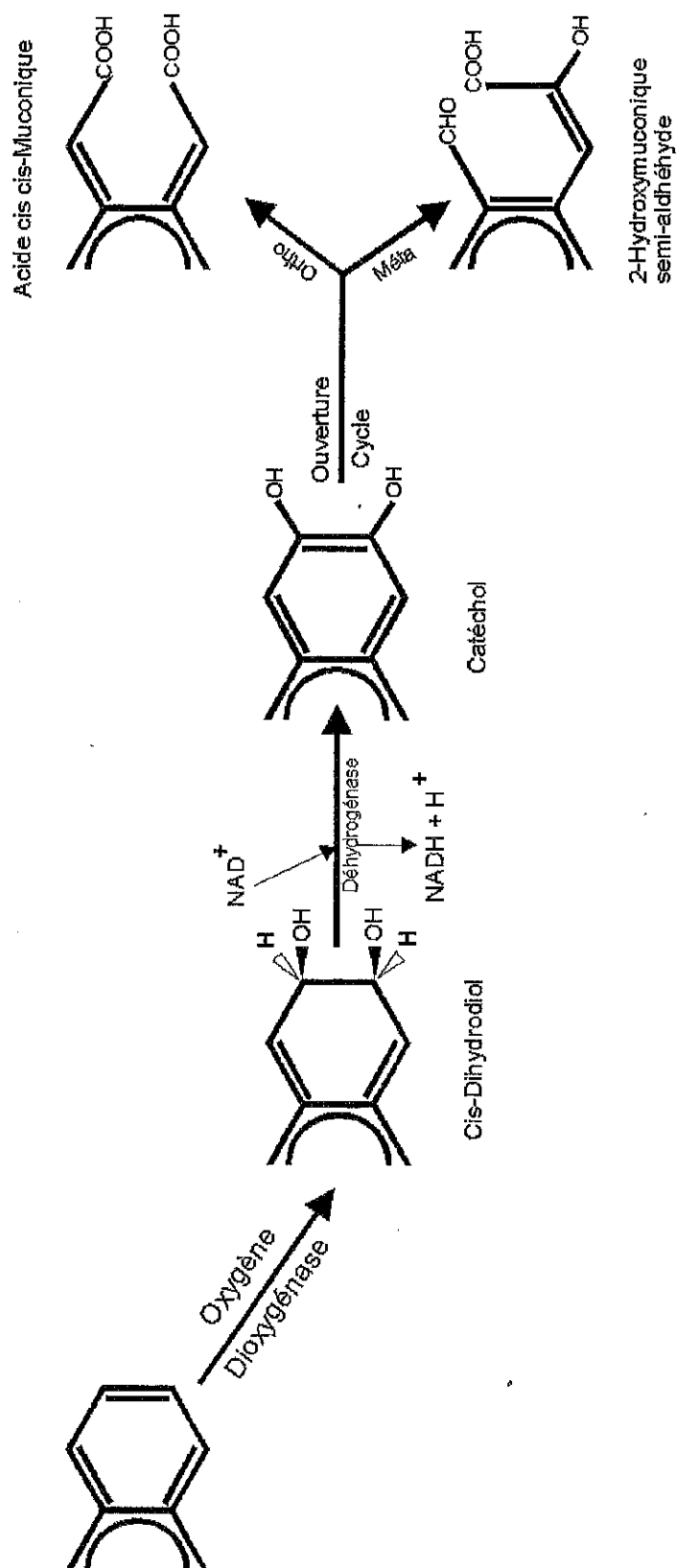


Figure 2: Voie métabolique générale utilisée par les bactéries pour l'oxydation des HAP (Cerniglia, 1992)

Les voies métaboliques complètes de dégradation pour le naphthalène, l'anthracène et le phénanthrène ont été publiées et impliquent toutes des systèmes enzymatiques mettant en œuvre des dioxygénases et déhydrogénases (Cerniglia, 1993, 1992, 1984). Les gènes codant pour ces enzymes ont été identifiés en suivant la dégradation du naphthalène.

Par exemple, chez *Pseudomonas putida* PpG7, 11 gènes participant à l'oxydation des HAP sont situés sur deux opérons portés sur un plasmide nommé NAH7. Le premier opéron, nommé *nah* contient les enzymes qui transforment le naphthalène en salicylate. Le deuxième opéron, *sal*, encode les enzymes qui oxydent le salicylate en catéchol et effectuent le clivage du cycle en position *méta*. (Zylstra et Gibson, 1991 ; Haigler et Gibson, 1990). L'induction et le contrôle de ces deux opérons sont effectués par la présence de salicylate et cette voie métabolique est aussi appelée voie du salicylate.

Peu de voies métaboliques complètes pour les HAP plus lourds ont été publiées jusqu'à maintenant. Parce que la structure de base des HAP est la même, il est probable que les voies métaboliques des HAP lourds soient semblables à celles des plus légers. Des voies métaboliques pour le fluoranthène et le pyrène ont été proposées et elles comportent plusieurs étapes où des intermédiaires de dégradation peuvent s'accumuler au lieu d'être complètement dégradés (Cerniglia, 1992, 1993). Jusqu'à maintenant, aucune voie n'a été proposée pour le chrysène ou le benzo(a)pyrène.

5.2 Champignons

Les champignons pouvant oxyder les HAP se classent en deux catégories, soit les champignons qui peuvent s'attaquer à la lignine (polymère de composés aromatiques présents dans la matière végétale) et ceux qui ne le font pas. Les champignons non-ligninolytiques ont plutôt tendance à détoxifier les HAP tandis que les espèces ligninolytiques tendent à effectuer le clivage des cycles aromatiques.

Les champignons non-ligninolytiques tel que *Cunninghamella elegans*, métabolisent les HAP selon des voies similaires aux systèmes enzymatiques des mammifères. La réaction est initiée par l'époxydation d'un cycle aromatique par l'ajout

d'un atome d'oxygène moléculaire qui transforme le cycle en arène oxyde (Figure 3). Cette réaction est catalysée par une monooxygénase contenue dans le cytochrome P450. Par la suite, l'arène oxyde peut être transformée en trans-dihydrodiol par une époxyde hydrolase ou être spontanément réarrangée en molécule phénolée. Les trans-dihydrodiols peuvent ensuite être transformés en catéchol ou s'accumuler comme métabolites. Les phénols peuvent être conjugués à des molécules comme le glucose, le sulfate, le xylose ou l'acide glucoronique (Cerniglia et Atlas, 1993 ; Cerniglia, 1992). Certains métabolites ainsi créés sont des cancérigènes actifs mais plusieurs sont généralement moins toxiques que le HAP non oxydé.

Chez les champignons ligninolytiques comme *Phanerochaete chrysosporium*, des peroxydases et de ligninases s'attaquent au cycle aromatique en lui ajoutant 2 atomes d'oxygène moléculaire pour créer une quinone. Le cycle peut ensuite être ouvert suite à une hydrolyse. Une fois le clivage du cycle effectué, les enzymes peuvent dégrader la molécule et attaquer le prochain cycle. Bien que plusieurs intermédiaires de dégradation puissent s'accumuler, une partie des HAP ainsi oxydés se retrouve complètement dégradée (Paszczynski *et al.*, 1995 ; Sanglard *et al.*, 1986).

6. PARAMÈTRES DE LA BIODÉGRADATION DES HAP.

Malgré le fait que plusieurs bactéries et champignons capables de dégrader les HAP aient été isolés, l'efficacité de certains traitements biologiques reste encore limitée. En général, les HAP ayant 3 cycles et moins sont éliminés rapidement, mais les HAP plus lourds sont plus récalcitrants et peuvent persister dans les sols même après traitement. Plusieurs études et revues de littérature sur les facteurs qui limitent la biodégradation des hydrocarbures, dont les HAP, ont été publiées (Kästner et Mahro, 1996 ; Kotterman *et al.*, 1996 ; Siron *et al.*, 1995 ; Zhou et Crawford, 1995 ; Providenti *et al.*, 1993 ; Wilson et Jones, 1993 ; Walter *et al.*, 1991 ; Leahy et Colwell, 1990 ; Weissenfels *et al.*, 1990 ; Morgan et Watkinson, 1989 ; Atlas, 1981). Bien qu'un large éventail de facteurs joue un rôle important dans l'efficacité d'un biotraitement, une attention particulière sera portée sur les paramètres impliqués dans la présente étude, soit les facteurs environnementaux (la

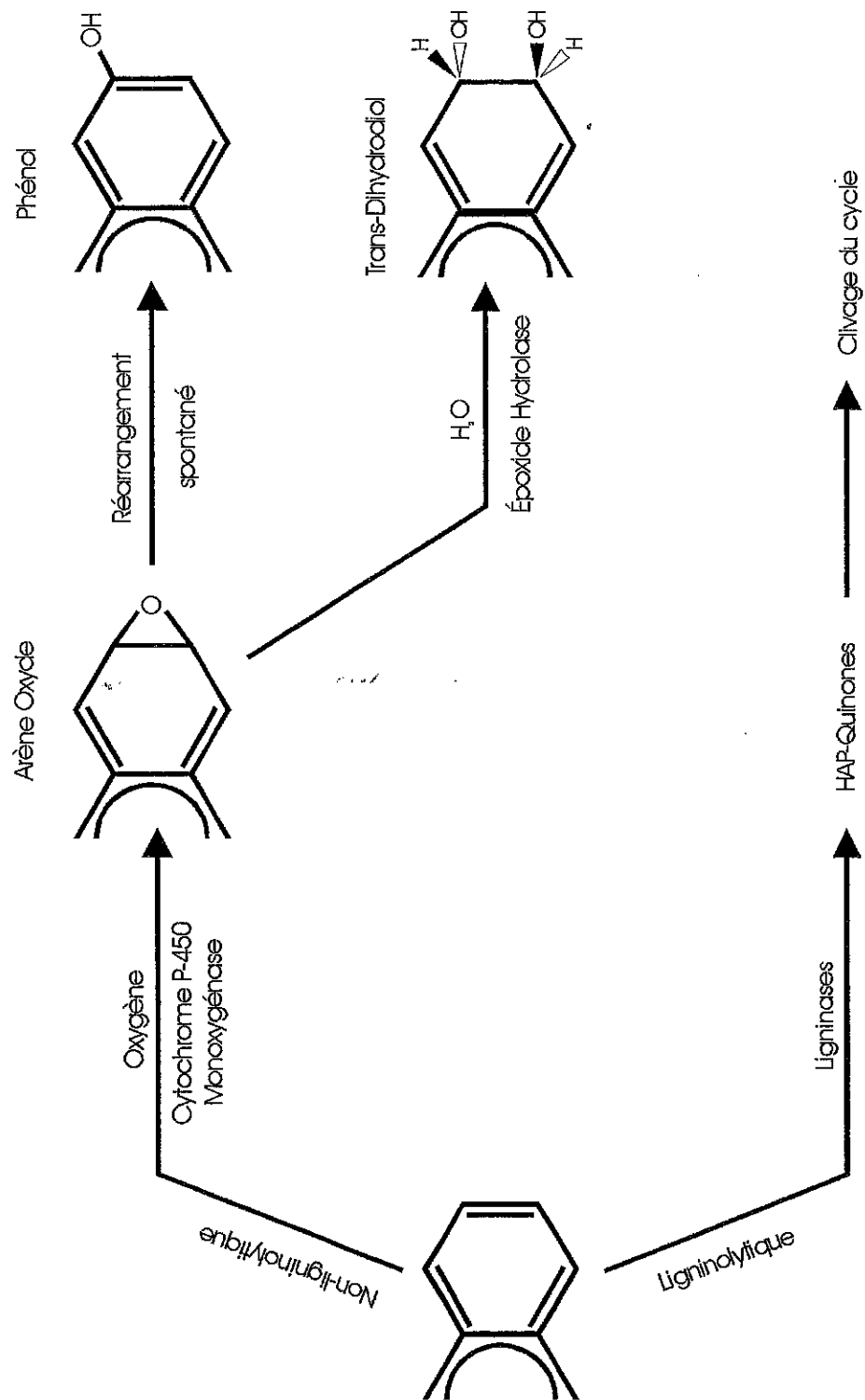


Figure 3: Voies métaboliques générales utilisées par les champignons pour l'oxydation des HAP (Cerniglia, 1993)

température, l'oxygénation, le pH et l'humidité du milieu), les rapports entre nutriments organique et inorganique (azote et phosphore) ainsi que la biodisponibilité des HAP.

6.1 Facteurs environnementaux des sols

La biodégradation des HAP par des microorganismes est, en tout premier lieu, influencée par les facteurs environnementaux du milieu. Le Tableau 4 résume les conditions environnementales qui favorisent la biodégradation des HAP.

La température affecte le rythme métabolique des microorganismes et est souvent directement proportionnelle au taux de biodégradation des hydrocarbures, incluant les HAP. Des études sur la biodégradation des HAP à basse température ont démontré une biodégradation lente du phénanthrène par des bactéries aux alentours de 0°C (Siron, *et al.*, 1995). Cette biodégradation a augmenté considérablement avec l'accroissement de la température. Bien que la biodégradation des HAP puisse s'effectuer à basse température, la température optimale se situe dans l'intervalle 20-30°C (Weissenfels *et al.*, 1990 ; Heitkamp *et al.*, 1988a).

L'humidité d'un sol affecte le métabolisme et le mouvement des microorganismes dans cette matrice. De plus, une quantité d'eau insuffisante dans un sol limite la solubilisation et le transport des contaminants et des nutriments (Morgan et Watkinson, 1989). Un sol saturé d'eau entre 30 et 90% est considéré comme optimal à la biodégradation des HAP (Dibble et Bartha, 1979). L'observation d'activités de biodégradation dans les valeurs inférieures de cet intervalle a été attribuée à l'interaction entre les contaminants et les sols. En s'adsorbant aux particules d'un sol, les contaminants diminuent sa capacité de rétention d'eau. Ceci augmente ainsi la quantité d'eau disponible aux microorganismes.

L'acidité d'un sol affecte la composition de la population microbienne indigène. Contrairement aux milieux aquatiques, le pH d'un sol peut varier grandement d'un site à l'autre, allant de 2,5 dans les sites miniers à 11,0 dans les déserts alcalins (Leahy et

Tableau 4 : Facteurs environnementaux affectant la biodégradation des HAP dans les sols

Paramètre	Valeurs requises pour l'activité microbienne	Valeurs optimales permettant la biodégradation des HAP
Température (°C)	15-45	20-30
Humidité du sol	25-85% de la capacité du sol	30-90%
pH du sol	5,5-8,5	7,0-7,8
Contenu en oxygène	Aérobie : 10% (v/v) de pores aérées. Anaérobie : moins de 1% (v/v)	10-40% d'O ₂
Nutriments	N et P pour croissance bactérienne. Rapport C : N : P de 120 :10 :1	C : N de 60 : 1 C : P de 800 : 1

(Sims *et al.*, 1990)

Colwell, 1990). Les microorganismes hétérotrophes sont favorisés par les sols ayant un pH près de la neutralité. Par contre, les champignons sont plus tolérants aux sols acides. Les activités de biodégradation des hydrocarbures ont été observées à des pH situés entre 5,5 et 8,5. Par contre, une biodégradation optimale des HAP a été observée à un pH de 7,8 (Dibble et Bartha, 1979).

L'oxygène joue un double rôle dans la biodégradation des contaminants. En premier lieu, il agit comme l'accepteur d'électron terminal dans la respiration aérobie. En plus, il sert de substrat dans les réactions enzymatiques impliquant des oxygénases lors des attaques sur les cycles aromatiques (Providenti *et al.*, 1993). Une oxygénation suffisante est donc vitale pour une bonne métabolisation aérobie des HAP. La disponibilité de l'oxygène dans un sol dépend du taux d'utilisation par la microflore indigène, le type de sol et l'humidité (Bossert et Bartha, 1984). Un apport d'oxygène correspondant à des valeurs entre 10-40% du volume d'un sol (des pores contenant de l'oxygène) est considéré comme optimal pour la biodégradation des HAP (Wilson et Jones, 1993).

6.2 Rapport C : N : P

Comme tous les organismes vivants, les microorganismes nécessitent un apport d'azote et de phosphate pour leur croissance. La présence de ces nutriments, en quantité suffisante, dans un sol est alors très importante pour un traitement biologique efficace. Un rapport optimal entre les concentrations de carbone, d'azote et de phosphore (C : N : P) est nécessaire pour assurer une croissance microbienne constante et équilibrée. Les sols contaminés avec de fortes concentrations de HAP possèdent un rapport C : N : P favorisant grandement le carbone. Des ajouts d'azote et/ou de phosphore sont alors souvent effectués aux sols contaminés afin d'atteindre le rapport optimal de 120 : 10 : 1 qui favorise la croissance des microorganismes utilisant les HAP (Wilson et Jones, 1993 ; Leahy et Colwell, 1990).

6.3 Biodisponibilité des HAP

Une des principales limites à l'efficacité des traitements biologiques pour les HAP lourds est la faible biodisponibilité de ces composés, c'est-à-dire leur faible accessibilité

comme source de carbone et d'énergie pour les microorganismes. Cette biodisponibilité est influencée par deux facteurs principaux, soit l'adsorption aux particules d'un sol ainsi qu'une très faible solubilité dans l'eau.

Plusieurs HAP s'attachent solidement aux particules de sol ou sont pratiquement insolubles dans l'eau (Mihelcic *et al.* , 1993). Or, les HAP sont reconnus comme étant dégradés sous forme solubilisée seulement (Thomas *et al.* , 1986 ; Wodzinski et Coyle, 1974). Une croissance bactérienne exponentielle, non limitée par l'apport de carbone, a été observée dans des cultures inoculées en présence de HAP solubilisés (Tiehm, 1994). Par contre, des croissances linéaires, limitées par le taux de dissolution des HAP, ont été observées dans des cultures inoculées en présence de HAP sous forme cristalline (Tiehm et Frizsche, 1995).

D'autres études ont démontré que les taux de croissance de certaines souches de *Norcardia* et de *Pseudomonas* étaient inversement proportionnels à la solubilité des HAP utilisés comme source de carbone (Providenti *et al.* , 1993). Par exemple, le naphthalène, un HAP à deux cycles dégradé relativement facilement, a une solubilité de 31,7 mg/L. La solubilité du phénanthrène (3 cycles) et du pyrène (4 cycles) sont de 1,3 et 0,14 mg/L respectivement (Cerniglia, 1993). Le chrysène, principal HAP (à 4 cycles) de cette étude, a une solubilité d'environ 0,002 mg/L (Mackay et Shiu, 1977).

7. LE CHRYSÈNE

Le chrysène servira de modèle de HAP de haut poids moléculaire dans cette étude. Il est retrouvé en concentrations supérieures aux normes gouvernementales dans plusieurs des sols contaminés aux HAP (Beaulieu et Drouin, 1998 ; Wilson et Jones, 1993). C'est un HAP ayant quatre cycles aromatiques fusionnés en forme de «s» (Figure 1). Il est généralement considéré comme un composé faiblement cancérigène lors d'études sur les animaux (Sheu *et al.* , 1994 ; Scribner, 1973). Par contre, lorsque qu'il est activé par le métabolisme des mammifères, il est transformé en dérivés qui sont des cancérigènes et des mutagènes plus puissants (Cheung *et al.* , 1993 ; Amin *et al.* , 1985 ; Wood *et al.* , 1977 ;

Sims, 1970). Ceci en fait un des contaminants retrouvés sur la liste des polluants prioritaires des agences environnementales canadiennes et américaines (Meek *et al.*, 1994 ; Keith et Telliard, 1979).

Le chrysène est peu biodisponible. C'est une molécule très hydrophobe dont la solubilité est très faible (Mackay et Shiu, 1977). Elle a une solubilité proche du benzo(a)pyrène, un HAP à 5 cycles aromatiques et 70 fois plus faible que le pyrène, un autre HAP à 4 cycles aromatiques. Le chrysène est un exemple parfait d'un HAP potentiellement dangereux qui est récalcitrant aux traitements biologiques des sols contaminés. Très peu de données sur les mécanismes de sa biodégradation ont été publiées à ce jour.

7.1 Microorganismes pouvant oxyder le chrysène

Un nombre restreint de microorganismes pouvant oxyder le chrysène ont été répertoriés. Chez les bactéries, seules trois souches capables de dégrader le chrysène ont été isolées et identifiées. Chez les champignons, 5 souches pouvant produire des intermédiaires de biodégradation du chrysène ont été rapportées.

7.1.1 Bactéries

Walter *et al.* (1991) ont isolé, à partir d'un sol contaminé, une souche de *Rhodococcus* nommé UW1 capable de dégrader le chrysène par co-métabolisme en présence de pyrène. De plus, cette souche a été en mesure de croître dans une culture liquide ayant le chrysène comme unique source de carbone. Par contre, l'utilisation de l'oxygène par la souche en culture était d'environ 30 fois inférieure en présence de chrysène par rapport au pyrène comme seule source de carbone ce qui témoigne de la plus faible biodisponibilité du chrysène.

Caldini *et al.* (1995) ont isolé des souches à partir d'un sol contaminé aux hydrocarbures en inoculant les microorganismes indigènes sur des géloses ne contenant que le chrysène comme unique source de carbone. Toutes les souches purifiées et isolées se sont avérées être de la même espèce, soit *Pseudomonas fluorescens*. Afin d'étudier la

biodégradation du chrysène, la souche a été incubée dans une culture liquide à laquelle une solution d'acétonitrile (un solvant organique miscible à l'eau) et de chrysène a été ajoutée. Il a été proposé que l'acétonitrile permet d'augmenter la solubilité du chrysène dans la culture sans pour autant être toxique pour la souche. Il a été reporté que cette souche avait une croissance exponentielle dans ces cultures, mais il faut noter que la culture contenait d'autres sources de carbones comme le solvant organique et 0,25 mg/l de chacun des éléments nutritifs suivants : peptone, extrait de levures et amidon. Une biodégradation d'environ 0,65 mg/l de chrysène (soit 65% du chrysène ajouté) a été observée lors des 4 premiers jours d'incubation. Aucune biodégradation supplémentaire n'a été observée.

Ye *et al.* (1996) ont démontré que la souche EPA 505 de *Sphingomonas paucimobilis* pouvait dégrader, après 16 heures en culture liquide, 1,25 mg/l de chrysène sur les 10 mg/l présents. Pour comparer cette activité, la même souche a dégradé 8,0 mg/l de pyrène sur les 10 mg/l présents dans les mêmes conditions et dans le même temps. De plus, des études de minéralisation avec des HAP marqués au ^{14}C , à partir des mêmes cultures liquides, ont démontré une minéralisation (dégradation complète en CO_2) d'environ 18% du chrysène dégradé, soit environ 0,25 mg/l en 16 heures. Ce taux de minéralisation a continué de façon linéaire par après, indiquant qu'il s'est maintenu constant. Il faut noter que la souche avait été incubée en présence de fluoranthène avant d'être recueillie et inoculée dans les nouvelles cultures. De plus, les HAP ont été ajoutés aux cultures, contenant déjà la souche, en étant solubilisés dans l'acétone, ce qui pouvait aussi augmenter leur biodisponibilité. Une étude précédente sur cette souche avait montré qu'elle pouvait oxyder le chrysène en co-métabolisme en présence du fluoranthène (Mueller *et al.*, 1990).

7.1.2 Champignons

Une souche de *Cunninghamella elegans* utilisée par Pothuluri *et al.* (1995) a été en mesure de métaboliser le chrysène en 2 intermédiaires distincts, soit le chrysène-2-sulfate et le chrysène-2-hydroxy-8-sulfate. Ces deux métabolites représentaient environ 33% du

chrysène total initialement présent dans les cultures. Il a été proposé que ces composés représentent les premières étapes d'une voie de détoxification du chrysène.

Kiehlmann *et al.* (1996) ont démontré que 3 souches de *Penicillium* dont *P. janthinellum* ainsi qu'une souche de *Syncephastrum racemosum* pouvaient oxyder le chrysène. Une fois de plus, aucune de ces souches n'a dégradé complètement le chrysène. Par contre, la souche *P. janthinellum* SFU403 a été en mesure de transformer le chrysène en *trans*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysène. Trois autres intermédiaires de métabolisation ont été observés mais non identifiés. À notre connaissance, aucune indication que l'oxydation du chrysène par des champignons s'effectuant dans les sols n'a été rapportée.

8.0 TECHNIQUES DE CULTURES

8.1 Techniques traditionnelles

Plusieurs des études présentées dans cette revue ont démontré la biodégradation de divers HAP en utilisant des techniques de cultures reconnues comme traditionnelles telles les cultures en milieu liquide, les cultures en sol et celles combinant les deux comme les microcosmes et les « slurries ».

Les cultures liquides ont l'avantage d'être simples tout en permettant de suivre la biodégradation d'un HAP dans un milieu minimal où il est possible de contrôler toutes les substances chimiques qui interagissent avec les microorganismes à étudier (Bouchez *et al.*, 1996 ; Lirette, 1996 ; Kotterman *et al.*, 1996 ; Schneider *et al.*, 1996 ; Shuttleworth et Cerniglia, 1996 ; Siron *et al.*, 1995 ; Stringfellow et Aitken, 1995 ; Tiehm et Fritzsche, 1995 ; Boldrin *et al.*, 1993 ; Walter *et al.*, 1991 ; Mueller *et al.*, 1990 ; Heitkamp *et al.*, 1988b). Avec cette technique, 2 des 3 souches bactériennes pouvant oxyder le chrysène ont été isolées et identifiées (Walter *et al.*, 1991 ; Mueller *et al.*, 1990). Le principal désavantage de ces cultures est la très faible solubilité des HAP de haut poids moléculaire qui ne peuvent être dégradés que très lentement.

Les cultures avec des échantillons de sol non saturé en eau présentent des modèles intéressants pour l'étude de la biodégradation dans un milieu plus près de ce qui est retrouvé dans l'environnement. Ces cultures permettent aussi d'étudier la biodégradation de divers HAP par la microflore indigène totale d'un sol contaminé. Relativement peu d'études de biodégradation des HAP ont été effectuées avec ce type de méthode (Kästner et Mahro, 1996 ; Mahro *et al.* , 1994 ; Stegman *et al.* , 1991 ; Sims *et al.* , 1990). Les HAP, surtout ceux de haut poids moléculaire, ont tendance à s'attacher aux molécules de sol, ce qui peut limiter l'étude de leur dégradation. De plus, les HAP, compte tenu de leurs faibles solubilités, nécessitent la présence d'assez d'eau pour favoriser ou améliorer leur biodisponibilité pour les microorganismes. Donc d'un point de vue de la recherche, cette méthode est limitante pour effectuer l'étude de la biodégradation des HAP lourds tels le chrysène.

Les cultures avec des échantillons de sol sursaturé en eau offrent l'avantage d'utiliser un plus grand volume d'eau, ce qui permet une plus grande solubilisation des HAP. Elles permettent ainsi d'étudier la microflore indigène totale sous des conditions plus favorables. De plus, elles facilitent l'étude des interactions entre HAP, eau et sol. La différence entre les cultures en «slurry» (Coates *et al.* , 1996 ; Abe *et al.* , 1995) et les microcosmes (Lirette, 1996 ; Bouchez *et al.* , 1995 ; Heitkamp et Cerniglia, 1988) réside principalement dans la quantité d'eau ajoutée aux échantillons de sols. Les microcosmes contiennent juste assez d'eau pour couvrir le sol présent dans les cultures tandis que les «slurries» contiennent beaucoup plus d'eau. La biodégradation lente, mais significative, du chrysène par une microflore indigène d'un sol contaminé a été démontrée en utilisant des microcosmes (Lirette, 1996). Avec ce type de méthode, la biodégradation des HAP lourds, lorsqu'elle se fait, s'effectue très lentement tout comme dans les autres types de cultures dites traditionnelles.

8.2 Nouvelles approches

Afin de développer de nouvelles approches pour améliorer la biodégradation des HAP lourds comme le chrysène et faciliter l'étude des microorganismes capables de les

dégrader, il a fallu modifier les méthodes de cultures traditionnelles. Plusieurs des méthodes présentées dans le cadre de cette revue sont, en fait, des ajouts de substances organiques aux cultures afin d'augmenter la solubilité des HAP et ainsi les rendre plus biodisponibles.

8.2.1 Surfactants et biosurfactants.

L'ajout de surfactants à des milieux de cultures afin d'augmenter la solubilité des composés à dégrader est devenu une pratique de plus en plus répandue ces dernières années. Les surfactants sont des molécules, synthétiques ou biologiques, composés d'une partie hydrophile et d'une autre hydrophobe. Un surfactant d'origine biologique est souvent appelé un biosurfactant. Cette caractéristique leur permet de former des micelles, des agrégats sphériques de surfactants ayant leur partie hydrophile à l'extérieur et leur région hydrophobe vers le centre. La formation de micelles permet de solubiliser les composés, tels les HAP lourds, dans leur partie hydrophobe et ainsi augmenter la quantité de composés «solubilisés» dans le milieu. Cette augmentation de la solubilité des composés hydrophobes permet souvent, par un mécanisme encore peu compris, d'augmenter leur biodégradation (Rouse *et al.*, 1994). Plusieurs études sur la biodégradation des HAP en présence de surfactants ont été publiées (Déziel *et al.*, 1996 ; Jiminez et Bartha, 1996 ; Thibeault *et al.*, 1996 ; Grimberg *et al.*, 1995 ; Providenti *et al.*, 1995a et 1995b ; Tsomides *et al.*, 1995 ; Volkerling *et al.*, 1995). À notre connaissance, aucune biodégradation du chrysène par l'ajout de surfactants à des cultures n'a été rapportée. Ce type d'ajout ne s'appliquant pas à cette étude, nous nous contenterons de suggérer les références présentées plus haut.

8.2.2 Solvants organiques.

L'ajout d'un solvant organique dans un milieu liquide peut aussi augmenter la solubilité d'un composé hydrophobe. Par contre, ils sont généralement considérés comme étant toxiques envers les microorganismes de la culture (Inoue et Horikoshi, 1991 ; Vermuë *et al.*, 1993). Malgré cela, certaines souches bactériennes tolérantes ont démontré

une biodégradation significative de HAP en culture liquide, en présence de différents solvants organiques.

Abe *et al.* (1995) ont isolé trois souches bactériennes, prélevées à 1200 m sous l'océan. Ces trois souches se sont avérées tolérantes à plusieurs solvants organiques tels le benzène, le toluène et le p-xylène à raison de 10% (v/v). De plus, des activités de biodégradation du naphthalène et du biphenyl ont été observées en présence de 10% (v/v) de certains solvants, particulièrement dans l'hexane, le cyclohexane et l'isooctane. Il faut noter que ces trois solvants étaient aussi dégradés par les souches, ce qui pourrait indiquer un mécanisme de co-métabolisme.

Caldini *et al.* (1995) ont utilisé un solvant miscible à l'eau, l'acétonitrile, pour augmenter la solubilité du chrysène en culture liquide. Une biodégradation significative par une souche de *Pseudomonas fluorescens* a été observée. Bien qu'ils aient indiqué avoir ajouter une concentration théorique de 1,0 mg/l de chrysène au milieu, il n'ont pas mentionné la concentration d'acétonitrile totale dans la culture. Il semblerait que la concentration d'acétonitrile utilisée n'aie pas été toxique pour la souche tout en augmentant la solubilité du chrysène dans la culture. Cette étude est, à notre avis, la première à avoir démontrée une biodégradation significative du chrysène par une souche pure.

Ye *et al.* (1996), bien qu'ils n'en fassent pas état comme d'un facteur important, ont utilisé de l'acétone, un solvant volatil, pour solubiliser leurs HAP. L'ajout de ces solutions dans des cultures déjà inoculées et ensuite fermées hermétiquement aurait permis, en théorie, d'augmenter la solubilité des HAP dans la culture. La biodégradation significative, en quelques heures, de plusieurs HAP lourds par la souche EPA 505 de *Sphingomonas paucimobilis*, est un phénomène qui a été rarement rapporté à ce jour. Cette activité pourrait être attribuée à l'augmentation de la solubilité des HAP lourds combinée à l'excellent potentiel de biodégradation de cette souche.

L'utilisation de solvant reste toutefois problématique, particulièrement lorsqu'ils sont utilisés avec des populations mixtes de microorganismes comme la flore indigène d'un sol contaminé. Relativement peu de microorganismes sont tolérants aux solvants et beaucoup meurent en présence de concentrations supérieures à 0,1% (v/v) (Abe *et al.* , 1995 ; Vermuë *et al.* , 1993). Aussi, plusieurs solvants sont volatils et pourraient s'échapper des cultures aérobies, ramenant les HAP à leur solubilité initiale dans le milieu.

8.2.3 Cultures biphasiques

Un intérêt grandissant a été accordé à l'ajout d'une substance liquide non miscible avec l'eau et non toxique pour les microorganismes afin d'augmenter le taux de biodégradation de substances insolubles ou toxiques comme les HAP (Jimenez et Bartha, 1996 ; Vanneck *et al.*, 1995 ; Köhler *et al.* , 1994 ; Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993). Cette méthode consiste à ajouter une phase liquide hydrophobe à une culture liquide. Cette substance hydrophobe peut servir de substrat biodégradable ou de réservoir inerte dans lequel se solubilisent les composés insolubles. Les cultures liquides résultantes sont constituées de deux phases distinctes, soit le milieu aqueux et la phase hydrophobe. Pour cette raison, elles sont appelées cultures biphasiques. Un intérêt particulier est porté sur les phases hydrophobes non biodégradables car elles permettent d'utiliser une seule source de carbone à basse solubilité dans les cultures et de suivre sa biodégradation (Boethling, 1984 ; Vanneck *et al.* , 1995 ; Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993).

Le mécanisme survenant dans ces types de cultures implique, en premier lieu, une dissolution de la substance hydrophobe ou toxique dans la phase hydrophobe. Ensuite, cette substance diffuse dans le milieu aqueux selon sa solubilité. Les microorganismes vont transformer ou dégrader la substance présente dans le milieu aqueux ou, par un mécanisme encore peu compris, effectuer la dégradation de la substance solubilisée dans la phase hydrophobe directement à l'interface des deux phases (Collins et Daugulis 1996 ; Ascon-Cabrera et Lebeault 1995a, 1995b et 1993). Il a été rapporté que le taux de transfert des substances aux microorganismes, ainsi que le taux de biodégradation, sont

principalement dépendants de la surface de contact entre les deux phases (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995a et 1995b ; Köhler *et al.* , 1994).

Une application intéressante de cette technique, pour enrichir une population bactérienne dégradant des composés xénobiotiques, a été développée par Ascon-Cabrera et Lebeault (1993). En utilisant de l'huile de silicone, à raison de 20% (v/v), comme phase hydrophobe et non biodégradable, ils ont été en mesure d'isoler plusieurs microorganismes capables de dégrader des composés comme le 1,2 dichlorobenzène et le 1,2,3-trichlorobenzène. Ces composés étaient l'unique source de carbone de la culture. Les cultures ont été agitées constamment, ce qui a eu pour effet d'augmenter la surface de contact entre l'huile et le milieu de culture et d'améliorer le taux de biodégradation.

Un système semblable a été utilisé pour la biodégradation des HAP par Vanneck *et al.* (1995). La composition des cultures était : milieu minimal minéral comme phase aqueuse et d'environ 30% (v/v) d'huile de silicone comme phase hydrophobe. L'activité de biodégradation sur un mélange de cinq HAP (naphtalène, phénanthrène, fluoranthène, pyrène et benzo(a)pyrène), à raison de 200mg/L d'huile, a été suivie. Ces cultures ont été inoculées avec une population mixte de microorganismes provenant d'un sol contaminé aux hydrocarbures lourds. Après 40 jours d'incubation, sous agitation constante, plus de 99% de chacun des HAP étaient dégradés dans les cultures biphasiques. À titre de comparaison, les cultures liquides sans phase hydrophobe présentaient aucune biodégradation pour le pyrène et le benzo(a)pyrène et environ 50% de dégradation pour les trois autres. Cette technique a été présentée comme une nouvelle approche pour étudier la biodégradation des HAP.

La méthode des cultures biphasiques développée pour l'étude de la biodégradation des HAP s'avère très intéressante pour les HAP de haut poids moléculaire. La possibilité d'augmenter grandement la solubilité de ces composés sans pour autant mettre les organismes en contact avec une substance toxique pouvant servir de source de carbone

devrait permettre une étude plus poussée de la biodégradation des HAP lourds tel le chrysène.

8.2.4 Vaporisation de cristaux de HAP sur un milieu solide.

Une technique servant à isoler des microorganismes ayant le potentiel de dégrader les HAP a été proposée par Kiyohara *et al.* (1982). Cette technique consiste à inoculer les microorganismes d'un sol contaminé sur une gélose et d'y vaporiser un HAP solubilisé dans un solvant volatil. Suite à une incubation de quelques jours, les colonies capables d'oxyder les HAP peuvent changer de couleur, colorer la gélose ou former des zones d'éclaircissement de HAP autour d'elles. Cette technique permet d'isoler rapidement des microorganismes qui peuvent, potentiellement, dégrader les HAP et a été utilisée pour isoler des microorganismes qui dégradent des HAP comme le naphthalène, le phénanthrène et le pyrène (MacGillivray et Shiaris, 1993 ; Heitkamp et Cerniglia, 1988). Par contre, à notre connaissance, aucun microorganisme capable de former une zone d'éclaircissement sur du chrysène n'a été rapporté.

8.3 Minéralisation

Des techniques de minéralisation, c'est-à-dire des techniques qui permettent de suivre la biodégradation complète des HAP en CO₂ ont été jumelées à plusieurs des techniques de cultures présentées précédemment tels les cultures liquides, les cultures biphasiques et les cultures additionnées de surfactants (Birman et Alexander, 1996 ; Guha et Jaffé, 1996 ; Li *et al.* , 1996 ; Schneider *et al.* , 1996 ; Shuttleworth et Cerniglia, 1996 ; Thibeault *et al.* , 1996 ; Ye *et al.* , 1996 ; Fu et Alexander, 1995 ; Labare et Alexander, 1995 ; Efroymson et Alexander, 1991 ; Heitkamp *et al.* , 1988a et 1988b ; Heitkamp et Cerniglia, 1988).

L'étude de la minéralisation d'un composé consiste à mélanger à la substance à étudier une quantité de cette substance dont certains de ces atomes de carbone ont été remplacés par un isotope radioactif tel le ¹⁴C (Singleton, 1994). Un système de captage du CO₂ est placé dans la culture et le dioxyde de carbone radioactif est quantifié dans un compteur à scintillation.

La plupart des études de minéralisation sur les HAP à quatre cycles et plus, publiées à ce jour, démontrent une biodégradation complète du pyrène par des microorganismes isolés de sites contaminés (Thibeault *et al.*, 1996 ; Ye *et al.*, 1996 ; Heitkamp *et al.*, 1988a et 1988b ; Heitkamp et Cerniglia, 1988). Par contre, très peu d'études ont démontré la minéralisation de HAP plus lourds tels le chrysène, le benzo(a)anthracène et le benzo(a)pyrène. (Schneider *et al.*, 1996, Ye. *et al.*, 1996).

La compatibilité des méthodes de minéralisation avec les autres techniques qui permettent d'augmenter la biodisponibilité des substances peu biodisponibles devrait permettre la mise au point de techniques sensibles et efficaces pour étudier la biodégradation des HAP lourds tel le chrysène.

9. Biodégradation des HAP dans le sol de sablière Thouin.

Un projet de décontamination par procédé biologique a été entrepris à la sablière Thouin, un site fortement contaminé aux hydrocarbures situé près de Montréal. Il s'est avéré que la microflore indigène de ce site avait la capacité de dégrader les HAP. Des résultats obtenus dans nos laboratoires ont démontré une bonne biodégradation des HAP légers (3 cycles aromatiques et moins). Par contre, un faible taux de biodégradation des HAP à 4 cycles avait été observé, soit environ 15% du total après 250 jours d'incubation en bioréacteurs. Des travaux d'optimisation de différents paramètres affectant la biodégradation ont ensuite été entrepris afin d'améliorer les taux de biodégradation des HAP de 2, 3 et 4 cycles aromatiques (Lirette, 1996). La mise au point de cultures en microcosmes sursaturés en milieu minimal minéral et agitées de façon régulière a montré que la microflore pouvait effectuer une biodégradation significative du fluorène, du phénanthrène, du pyrène et du chrysène en 60 jours. Une biodégradation complète du chrysène n'a pas été observée, probablement parce que les cultures n'ont pas été suivies assez longtemps.

Notre projet consistait à poursuivre ces travaux. Les travaux de recherches présentés tenteront de démontrer que les microorganismes indigènes de la sablière Thouin

sont capables de dégrader complètement un HAP récalcitrant comme le chrysène. Des techniques de cultures visant à améliorer la biodisponibilité du chrysène et à suivre la minéralisation du chrysène ont été développées et mises au point. Celles-ci ont permis l'isolement d'un consortium de microorganismes capable d'effectuer la dégradation du chrysène et l'étude de certains de leurs mécanismes de dégradation.

Matériel et méthodes

1. SOL CONTAMINÉ

Les échantillons de sol utilisés au cours de ces travaux de recherche proviennent de la sablière Thouin située à l'Assomption dans la région de Montréal. Cette sablière a été utilisée pour éliminer divers déchets industriels entre 1966 et 1968, dont des boues huileuses, des résidus de chaux, des barils de graisse et divers matériaux de construction. Le MEF a classé ce site comme un lieu dangereux. Ce site présente actuellement un potentiel de risque pour la santé publique et/ou un potentiel de risque élevé pour l'environnement. Les contaminants identifiés sur le site appartiennent principalement à la famille des hydrocarbures, dont une forte concentration de HAP. Le mélange de sol utilisé aux cours de ces travaux provenait d'un échantillonnage, effectué en juillet 1993, de plusieurs emplacements sur le site de la sablière. Ce mélange, nommé R20-27, a servi de lot de référence dans les expériences et a été entreposé à 4°C en absence de lumière pour minimiser tout changement dans la microflore indigène. La caractérisation chimique et microbiologique du sol a été effectuée lors de travaux précédents (Lirette, 1996). Les résultats de cette caractérisation sont résumés dans le Tableau 5. Ce sol est pauvre en azote, comme en témoigne le rapport C : N de 100 : 2. Des ajustements de ce rapport à 100:10, jugé optimal pour une biodégradation efficace, ont été effectués par l'ajout de 1 mg de nitrate d'ammonium pour chaque gramme de sol utilisé dans les microcosmes.

2. MICROORGANISMES

2.1 Flore indigène de la sablière Thouin

Les microorganismes impliqués dans les expériences en microcosmes étaient ceux constituant la microflore indigène retrouvée dans les échantillons de 50 g de sol de la sablière Thouin. Dans le cas des cultures liquides et biphasiques, les microorganismes indigènes de la sablière ont été isolés du sol puis utilisés comme inoculum. Pour ce faire, deux fois 250 g de sol (poids sec) de la sablière ont été pesés et ajoutés séparément à deux erlenmeyers stériles de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu minimal minéral Bushnell-Hass (BH) (0,2 g/L de sulfate de magnésium, 0,02 g/L de chlorure de calcium, 1 g/L de phosphate de monopotassium, 1 g/L de phosphate d'ammonium, 1 g/L de nitrate de potassium et 0,05 g/L de chlorure de fer) (Difco, Detroit). Ces erlenmeyers ont été agités

Tableau 5 : Caractéristiques chimiques et microbiologiques du sol de la sablière Thouin (Lirette, 1996)

Caractéristiques	Valeurs	Normes en ppm (critère C)
Chimiques :		
Humidité	4,9% (p/p)	
pH	6,98	
Rapport C : N : P	100 : 2 : 22	
Huiles et graisses	7786,0 ppm	5000
HAP	509,2 ppm	200
Microbiologiques :		
Microflore totale	$8,6 \times 10^6$ UFC / g	
Microflore dégradant potentiellement :		
Fluorène	$2,5 \times 10^5$ UFC / g	
Phénanthrène	$7,5 \times 10^4$ UFC / g	

vigoureusement pendant 20 minutes puis ils ont été laissés au repos pendant 5 minutes afin que le sol puisse sédimenter. Les surnageants contenant les microorganismes provenant du sol ont été récupérés et centrifugés à 2000 révolutions par minute (rpm) pendant 10 minutes pour se débarrasser des particules de sol résiduelles. Les surnageants ont ensuite été centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 minutes puis les microorganismes sédimentés ont ensuite été récupérés. Les culots contenant les microorganismes ont été lavés deux fois en ajoutant du milieu BH et en centrifugeant à 10 000 rpm. Les deux culots ont ensuite été récupérés ensemble dans 10 mL de milieu BH afin d'obtenir une forte concentration de microorganismes. Les milieux de cultures liquides et biphasiques ont étéensemencés avec cet inoculum à raison de 10% (v/v), soit 2,5 mL. Des conditions de cultures spécifiques pour les bactéries ou les champignons ont été utilisées dans ces cultures afin de favoriser l'un ou l'autre de ces groupes de microorganismes.

2.2 Souches de collection

2.2.1 Souche isolée en culture pure de la sablière Thouin

La souche bactérienne 57, isolée de la sablière Thouin lors de travaux précédents (Déziel, 1996), a été inoculée en culture biphasique. Cette souche de *Pseudomonas aeruginosa* est reconnue pour sa capacité de dégrader le phénanthrène en culture liquide. Elle a été conservée dans une solution de glycérol 20% (v/v) entreposée à -70°C. Pour préparer l'inoculum, un aliquot de 10 µL a été prélevé du tube congelé et étalé sur des géloses BH (1,5% (p/v) agar Noble, Difco) enrichies d'extrait de levures à raison de 0,5% (p/v). Après 48 heures de croissance à 30°C, toutes les colonies ($\approx 10^3$) ont été prélevées des géloses et suspendues dans 20 mL de milieu BH afin d'avoir un inoculum fortement concentré. Les milieux de cultures ont étéensemencés avec cette suspension à raison de 10% (v/v), soit 2,5 mL pour les cultures liquides et 3,0 mL pour les cultures biphasiques.

2.2.2 *Sphingomonas* S105 et S107

Les souches bactériennes de collection S105 et S107, appartenant au genre *Sphingomonas*, ont été utilisées dans des cultures biphasiques et de minéralisation. Elles ne provenaient pas de la sablière Thouin, elles ont été isolées à la base de poteaux de

téléphone lors de travaux précédents (Déziel, 1996). Elles peuvent croître en culture liquide en présence de pyrène comme unique source de carbone. Les procédures d'entreposage, de préparation de l'inoculum et d'ensemencement de ces souches ont été similaires à celles décrites précédemment pour la souche 57 de *P. aeruginosa*. Les cultures de minéralisation ont été ensemencées avec la suspension de ces souches à raison de 1,0 mL par bouteille, soit un inoculum de 9% (v/v).

2.2.3 Acclimatation des souches de collection

Pour acclimater les souches pures à la présence de HAP, des pré-cultures ont été préparées. Un erlenmeyer de 250 mL contenant 22,5 mL de milieu BH additionné de 0,5% (p/v) d'extrait de levures a été préparé pour chaque pré-culture. Une solution de phénanthrène (Aldrich, Milwaukee) solubilisé dans du éther éthylique (Anachemia, New York) a été ajoutée à l'erlenmeyer afin d'atteindre une concentration de 100 mg de phénanthrène par litre de culture. Après l'évaporation du solvant (24 heures), l'erlenmeyer a été ensemencé avec 2,5 mL de la suspension d'une souche pure, telle que décrit plus haut. La pré-culture a été incubée en absence de lumière à la température de la pièce dans un appareil New Brunswick modèle G25 (New Jersey) sous une agitation de 200 rpm. Après une semaine d'incubation, les pré-cultures ont été entreposées à 4°C avant de servir d'inoculum dans certaines cultures décrites plus loin.

3. CULTURES

3.1 Microcosmes bactériens.

Pour démontrer que la microflore indigène de la sablière contaminée peut dégrader les HAP, des cultures en microcosme ont été préparées dans des erlenmeyers de 500 mL. Un volume de 27 mL de milieu BH, ajusté à pH 7, a été ajouté dans chacun des erlenmeyers de sorte que le sol soit recouvert d'un mince film de milieu liquide. Cette phase liquide favorise la dissolution des HAP, ce qui devrait entraîner une meilleure dégradation de ces composés. Quatre HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène) (Aldrich, Milwaukee) ont été ajoutés dans chacun des erlenmeyers de 500 mL. Ils ont d'abord été solubilisés dans une solution de dichlorométhane (Anachemia, New York) puis

additionnés de sorte à obtenir, pour chacun, une concentration finale de 100 mg par kg de sol. Après l'évaporation du dichlorométhane dans les erlenmeyers (environ 24 heures), 50 grammes de sol de la sablière Thouin (poids sec) ont été ajoutés à chacune des cultures. Un ajout de 50 mg de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) a aussi été effectué dans chacune des cultures pour équilibrer le rapport C : N du sol. Les microcosmes ont été incubés à la température de la pièce, en absence de lumière. Ils ont été agités 5 minutes par jour à une vitesse de 300 rpm à l'aide d'un appareil New Brunswick modèle G25. Le pH des cultures a été mesuré quotidiennement et ajusté entre 6,8 et 7,3 avec des solutions de HCL 1N ou de NaOH 0.5N au besoin. Les cultures ont été pesées à intervalle régulier pour déterminer les pertes dues à l'évaporation. Ces pertes ont été compensées par l'addition d'eau stérile lorsque nécessaire.

Un contrôle abiotique a été préparé et jumelé à chacune des cultures, sauf celles prélevées avant l'incubation. Ces microcosmes abiotiques sont identiques aux cultures déjà décrites sauf qu'ils ont reçu 5 mL d'une solution de 400 mg/L de chlorure de mercure et 5 mL d'HCl 12N pour inhiber la croissance de la microflore indigène du sol.

3.2 Microcosmes champignons

Pour inhiber la croissance bactérienne et privilégier la croissance des champignons indigènes présents dans le sol de la sablière, la méthode des cultures en microcosmes a été modifiée. Un volume de 27 mL de milieu MYPD (0,3% (p/v) extrait de malt, 0,3% (p/v) extrait de levures, 0,5% (p/v) protéose peptone et 1% (p/v) dextrose) ajusté à pH 5 a été utilisé au lieu du milieu BH. Trois antibiotiques ont été ajoutés dans chacune des cultures, soient 2,7 mg de kanamycine, 5,4 mg de streptomycine et 6,5 mg de pénicilline G. L'ajout des HAP, l'ensemencement, la préparation de contrôles abiotiques et les conditions d'incubation étaient exactement comme dans la méthode des microcosmes bactériens. Le pH des cultures a été ajusté entre 4,9 et 5,1 avec des solutions de HCL 1N ou de NaOH 0,5N à chaque jour. L'évaporation dans les cultures a été déterminée et compensée de la même manière que précédemment sauf que du milieu MYPD stérile a été utilisé pour renouveler les éléments utilisés par les champignons.

3.3 Cultures liquides bactériennes

Des cultures liquides ont été effectuées pour suivre la biodégradation des HAP dans un environnement physico-chimique simplifié. Des erlenmeyers stériles de 250 mL contenant 22,5 mL de milieu BH ajusté à pH 7 ont été préparés. Une solution constituée de 4 HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène) dans le dichlorométhane a été ajoutée aux erlenmeyers afin d'atteindre une concentration finale pour chacun des HAP de 100 mg par litre de milieu liquide. Après l'évaporation du dichlorométhane (environ 24 heures), les cultures ont étéensemencées avec 2,5 mL de la suspension de la microflore indigène isolée de la sablière. L'incubation a été effectuée à la température de la pièce, en absence de lumière, et les cultures ont été agitées constamment à 200 rpm dans un appareil modèle G 25 de New Brunswick. Le pH des cultures a été ajusté entre 6,9 et 7,1 avec des solutions de HCL 1N ou de NaOH 0,5N lorsque nécessaire. L'évaporation dans les cultures a été déterminée et compensée avec de l'eau stérile tel que décrit précédemment.

Des contrôles abiotiques ont été préparés pour chacune des cultures liquides, sauf celles prélevées avant l'incubation. Ces contrôles abiotiques ont été préparés exactement comme les cultures liquides biotiques, sauf qu'elles n'ont pas étéensemencées.

3.4 Cultures liquides champignons

Pour sélectionner les champignons dans la microflore indigène de la sablière, la méthode de culture liquide décrite précédemment a été modifiée. Un volume de 22,5 mL de milieu BH additionné de 0,5% (p/v) d'amidon (BHA) et ajusté à pH 5 a été utilisé dans ces cultures. De plus, trois antibiotiques ont été ajoutés dans chacune des cultures soit : 2,25 mg de kanamycine, 4,5 mg de streptomycine et 5,4 mg de pénicilline. Un indicateur de pH, le rézazurin, a été ajouté au milieu de culture à raison de 2 mg/L de milieu. Le pH a été ajusté avec des solutions de HCL 1N ou de NaOH 0,5N à chaque jour. L'ensemencement, les conditions d'incubation et la compensation de l'évaporation ont été similaires aux cultures liquides pour les bactéries décrites plus haut.

3.5 Cultures liquides-acétonitrile bactéries

3.5.1 Solubilité du chrysène dans une solution eau-acétonitrile

Afin de déterminer si la quantité de chrysène dissous dans un milieu liquide augmentait de façon détectable lors d'un ajout d'acétonitrile, différentes solutions d'eau-acétonitrile ont été préparées et analysées. Une solution de 100 mL d'acétonitrile (Anachemia) contenant 0,1% (p/v) de chrysène a été préparée et filtrée avec une membrane résistante aux solvants (Fisher, USA) afin d'enlever les cristaux non dissous et d'obtenir une solution saturée en chrysène. Dans des éprouvettes de 15 mL, des mélanges de 10 mL d'eau distillée et différents volumes de la solution d'acétonitrile saturé de chrysène ont été préparés. Ces mélanges contenaient 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 et 20% (v/v) d'acétonitrile saturé de chrysène. Des échantillons de la solution saturée ont aussi été conservés afin de pouvoir quantifier la concentration initiale de chrysène dans l'acétonitrile. De plus, une solution d'eau distillée sursaturée de chrysène puis filtrée à été préparée afin de servir de contrôle négatif dans cette expérience. Étant donné les très faibles concentrations de chrysène retrouvées dans les cultures telles que rapportées avec cette méthode dans la littérature (≈ 1 mg/L) une méthode de quantification du chrysène en utilisant la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) a été développée. Cette méthode est décrite plus loin dans la section des analyses chimiques

3.5.2 Tolérance des microorganismes à l'acétonitrile

Afin de déterminer l'effet de l'acétonitrile sur la croissance des bactéries provenant de la suspension de microorganismes isolés de la sablière contaminée, différentes concentrations d'acétonitrile ont été ajoutées à différentes cultures liquides. Des erlenmeyers stériles de 250 mL, contenant différentes proportions d'acétonitrile et de milieu BH enrichi d'extraits de levures à 0,5% (p/v) ajusté à pH 7, ont été préparés. Les proportions d'acétonitrile par rapport au milieu liquide étaient de 0 ; 0,5 ; 1 ; 5 ; 10 et 20% (v/v). Chacun de ces erlenmeyers a étéensemencé avec 1 mL de la suspension de la microflore indigène de la sablière contaminée. Ces cultures liquides-acétonitrile ont été incubées pendant 2 jours dans les mêmes conditions que les cultures liquides décrites précédemment.

Des dénombrements de la population bactérienne sur des géloses «Plate Count Agar» (PCA) (Difco) ont été effectués au début de l'incubation et après 48 heures. Pour chaque dénombrement, une série de dilutions a été effectuée à partir d'une culture. Un aliquot de 0,1 mL d'une culture liquide-acétonitrile, vigoureusement agité, a été prélevé et ajouté à une éprouvette contenant 0,9 mL de milieu BH stérile. Après 30 secondes d'agitation, un aliquot de 0,1 mL a été transféré de l'éprouvette à une autre contenant 0,9 mL de milieu BH stérile. Cette opération a été répétée quatre fois de plus pour donner une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-6} . Un aliquot de 0,1 mL de chacune de ces dilutions a été étalé sur les géloses PCA. Ces géloses ont été incubées à 30°C pendant 48 à 72 heures et les colonies ont été dénombrées.

3.5.3 Cultures liquides-acétonitrile-chrysène

Suite aux résultats observés lors des deux expériences précédentes, des cultures liquides contenant 5% d'acétonitrile saturé de chrysène ont été préparées. Des bouteilles sérologiques de 100 mL contenant 17 mL de milieu BH stérile et 1 mL d'acétonitrile filtré et saturé de chrysène (≈ 100 mg/L), ont été préparées. Des inoculums de 2 mL de la suspension de la microflore indigène de la sablière ont été ajoutés aux cultures. Des contrôles abiotiques ont aussi été préparés en utilisant des erlenmeyers contenant 19 mL de milieu BH stérile et 1 mL de la solution d'acétonitrile-chrysène. La concentration finale de chrysène dans ces cultures était d'environ 5 mg/L. Ces bouteilles ont été scellées avec des bouchons de Téflon afin d'éviter l'évaporation de l'acétonitrile de la culture. Ces cultures ont été incubées dans les mêmes conditions de température, de noirceur et d'agitation que les cultures liquides décrites précédemment.

3.6 Cultures biphasiques bactéries

Afin d'augmenter la biodisponibilité du chrysène et d'en suivre la biodégradation, des cultures biphasiques ont été préparées. Des volumes de 22,5 mL de milieu BH ajusté à pH 7 ont été ajoutés à des erlenmeyers stériles de 250 mL. Ensuite, 5 mL de diméthyl polysiloxane (huile de silicone) ayant une viscosité de 20 centistokes (Aldrich) ont été

ajoutés à chacun des erlenmeyers. Une solution de chrysène, dans le dichlorométhane, a été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 100 mg de chrysène par litre d'huile. Après l'évaporation du dichlorométhane (environ 24 heures), les erlenmeyers ont été ensemencés avec un aliquot de 2,5 mL d'une suspension de la microflore indigène isolée du sol de la sablière Thouin. Les cultures ont été incubées à la température de la pièce et agitées à une vitesse de 200 rpm dans un appareil New Brunswick modèle G-25. Le pH ayant demeuré stable autour de 7,0 tout au long de l'incubation, n'a pas été ajusté.

Des contrôles abiotiques ont été préparés pour chacune des cultures biphasiques, sauf pour celles prélevées avant l'incubation. Ces contrôles abiotiques ont été préparés exactement comme les cultures liquides biotiques, sauf qu'elles n'ont pas été ensemencées.

3.7 Cultures biphasiques champignons

Pour vérifier si les champignons isolés du sol de la sablière contaminée pouvaient dégrader le chrysène en culture biphasique, des cultures ont été préparées de façon différente de celles décrites précédemment. Un volume de 22,5 mL de milieu BHA ajusté à pH 5 a été utilisé pour encourager la croissance des champignons. De plus, trois antibiotiques ont été ajoutés dans chacune des cultures soit : 2,25 mg de kanamycine, 4,5 mg de streptomycine et 5,4 mg de pénicilline. La procédure utilisée pour l'ajout de chrysène, l'ensemencement des cultures, la préparation de contrôles abiotiques et l'incubation a été similaire à celle utilisée pour les cultures biphasiques bactériennes.

3.8 Enrichissement des cultures biphasiques bactériennes

3.8.1 Repiquages

Afin d'enrichir les cultures biphasiques pour la biodégradation du chrysène, des repiquages dans des cultures fraîches contenant ce HAP ont été effectués de façon régulière. Après environ deux semaines d'incubation d'une culture biphasique contenant des bactéries indigènes de la sablière contaminée, plusieurs volumes de 2,5 mL ont été prélevés. Ces aliquots ont servi à inoculer des cultures biphasiques fraîches préparées tel que décrit précédemment. Ces nouvelles cultures étaient à leur tour repiquées après deux

semaines d'incubation dans les mêmes conditions qu'indiquées plus haut. Une fois la stabilité des cultures établie, c'est-à-dire qu'elles ont conservé leur activité de biodégradation suite à des repiquages, elles ont été repiquées de façon régulière et elles ont alors été désignées cultures de maintien.

3.8.2 Dilutions

Afin d'éliminer certaines bactéries qui ne peuvent dégrader le chrysène dans les cultures biphasiques de maintien, des séries de dilutions ont été effectuées. Lors d'un repiquage de la culture de maintien, un aliquot de 1 mL a été prélevé et ajouté dans une éprouvette contenant 9 mL de milieu BH stérile. Après une agitation vigoureuse, un aliquot de 1 mL a été prélevé et ajouté à une autre éprouvette contenant 9 mL de milieu BH. Cette procédure a été effectuée jusqu'à un facteur de dilution de 1 000 000 (10^{-6}). Des aliquots de 2,5 mL de chacune des dilutions (de 10^{-1} à 10^{-6}) ainsi que de la culture originale ont été inoculés dans de nouvelles séries de cultures biphasiques et ces dernières ont été incubées tel que décrit auparavant.

Suite aux analyses, la culture ayant étéensemencée avec l'inoculum le plus dilué, mais qui présentait une activité de biodégradation du chrysène, a été repiquée tel que décrit plus haut. La stabilité de cette culture a été établie en vérifiant qu'elle dégradait toujours le chrysène malgré les repiquages. Elle a ensuite été diluée de nouveau (de 10^{-1} à 10^{-4}) et la culture inoculée avec la dilution la plus élevée qui montrait une activité de dégradation lors d'un repiquage a été maintenue par repiquages réguliers. Le groupe de microorganismes qui composait cette culture stable a été désigné consortium chrysène. Des aliquots de 1.0 mL des cultures biphasiques de maintien contenant le consortium chrysène ont servi d'inoculum dans les cultures de minéralisation décrites plus loin.

4. MINÉRALISATION

Afin de vérifier si la biodégradation des HAP observée dans les cultures biphasiques est complète, des expériences de minéralisation ont été effectuées. Dans des bouteilles sérologiques de 100 mL, 9 mL de milieu BH ainsi que 1 mL d'huile de silicone

ont été ajoutés. Une solution de HAP (phénanthrène, pyrène ou chrysène) diluée dans le N,N-diméthylformamide (DMF) a ensuite été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 10 mg de HAP par litre de milieu liquide. Puis, le HAP marqué au ^{14}C correspondant a été ajouté à raison d'un compte de 110 000 désintégrations par minutes (dpm) par bouteille. Le [9- ^{14}C]-phénanthrène (8,3 mCi/mmol) (Sigma), le ^{14}C -pyrène (32 mCi/mmol) (Sigma) et le [5,6,11,12- ^{14}C]-chrysène (45,2 mCi/mmol) (Chemsyn Science Laboratories, Lenexa, KS) ont été utilisés. Après avoir laissé le solvant s'évaporer pendant 48 heures, un volume d'un mL d'huile de silicone stérile a été ajouté aux bouteilles. Ensuite, une trappe à CO_2 formée d'une éprouvette de 5 mL contenant 1 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 1% (p/v) a été placée dans la bouteille de façon à ce que l'éprouvette repose à l'intérieur de la bouteille sans se renverser. Ces bouteilles ont été inoculées avec 1 mL d'une culture de maintien du consortium chrysène ou avec 1 mL d'une suspension concentrée d'une souche pure. Les bouteilles ont ensuite été scellées hermétiquement à l'aide de bouchons de Téflon. Ces cultures ont été incubées, en absence de lumière, à la température de la pièce et ont été agitées constamment à 200 rpm dans un appareil New Brunswick modèle G-25.

Les prélèvements de KOH ont été effectués à l'aide d'aiguilles et de seringues à chaque temps d'incubation choisis. Tout le KOH de l'éprouvette (1 mL) a été transféré dans une fiole à scintillation. Un volume égal de KOH 1% (p/v) frais a été ajouté à l'éprouvette pour la rincer complètement. Ce volume a ensuite été combiné au premier dans la fiole à scintillation. Finalement, 1 mL de KOH frais 1% (p/v) ainsi que de l'oxygène (40 mL) ont été ajoutés dans le tube et dans la bouteille, respectivement. L'ajout d'oxygène permet d'éviter que ce paramètre devienne un facteur limitant pour la croissance des bactéries. Un volume de 5 mL de liquide à scintillation Ultima Gold XR (Packard Instruments, Meriden) a été ajouté au KOH prélevé. La fiole à scintillation a ensuite été agitée vigoureusement puis le comptage a été effectué. La radioactivité a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation modèle 3375 (Packard Instruments) suivant un programme de comptage de ^{14}C . Les valeurs obtenues ont été exprimées en désintégrations par minute ^{14}C (dpm ^{14}C).

Chacune des cultures de minéralisation a été effectuée en duplicata. Des contrôles abiotiques non inoculés ont été préparés en parallèle pour chacune des cultures. Tout compte équivalent à plus de 5 fois celui enregistré dans le contrôle abiotique radioactif correspondant a été considéré comme un résultat positif.

5. ANALYSES CHIMIQUES

5.1 Microcosmes

5.1.1 Extraction

Pour suivre la concentration des HAP dans les microcosmes après différentes périodes d'incubation, le contenu complet d'un des erlenmeyers a été extrait. Premièrement, la culture a été acidifiée à un pH inférieur à 3,0 par l'ajout de HCl 12N. Ensuite, 50 mL d'eau distillée ont été ajoutés pour faciliter les manipulations lors de l'extraction. Le solvant utilisé pour extraire les HAP du microcosme était le diétyl éther (Anachemia). Ce solvant a été ajouté en trois étapes successives, à raison de 30, 15 et 15 mL respectivement. Le 9-méthylanthracène (Aldrich), un HAP absent du sol de la sablière Thouin, a été utilisé comme standard interne. Il était présent dans le premier volume de solvant d'extraction à une concentration de 666,7 mg/L. Ce standard a permis de quantifier les HAP solubilisés dans le solvant et de corriger pour toutes pertes encourues lors de l'extraction. Il était aussi caractérisé par un temps de rétention connu et différent des 4 HAP ajoutés d'après les analyses en chromatographie à phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). À chacune des trois étapes où le solvant a été ajouté à l'erlenmeyer, le mélange a été agité vigoureusement pendant 1 minute puis la phase solvant a été décantée à l'aide d'une ampoule de 250 mL. La phase solvant a été prélevée à chaque fois, transférée dans un erlenmeyer propre et gardée sur de la glace pour minimiser l'évaporation du solvant. Lorsqu'une émulsion stable entre la phase solvant et aqueuse se formait, une centrifugation d'une minute à 2000 rpm dans un appareil Damon-IEC (U.S.A) a été effectuée pour briser l'émulsion. Pour déshydrater la phase solvant recueillie, du Na₂SO₄ anhydre a été ajouté. Due à l'évaporation du solvant pendant l'extraction, l'extrait a ensuite été transféré dans un ballon jaugé pour ajuster son

volume à 50 mL avec du *éther éthylique* afin d'obtenir une concentration finale du standard interne d'environ 400 mg/L.

5.1.2 Chromatographie en phase gazeuse (GC)

L'analyse des quatre HAP a été effectuée en utilisant un appareil de chromatographie en phase gazeuse modèle 5890 (Hewlett-Packard, Avondale) jumelé à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). La colonne capillaire était de type ULTRA 2 non polaire (Hewlett-Packard) et ses dimensions étaient de 25 m x 0,2 mm x 0,33 μ m. L'intérieur de la colonne était composé de 5% de diphenyl et de 95% de diméthyl polysiloxane. Le gaz porteur était l'hélium. Les injections d'échantillons à analyser ont été effectuées en mode "split" et le programme d'intégration était le HPCHEM version 3365 Analyzer 1 (Hewlett-Packard). Deux microlitres ont été injectés pour chaque échantillon. Le four a été programmé comme lors de travaux antérieurs (Lirette, 1996). La température initiale était de 70°C suivie d'une augmentation de 20°C/minute jusqu'à 240°C et maintien de cette température pendant 7 minutes. Ensuite, une augmentation de 10°C/minute jusqu'à 280°C a été effectuée et cette température a été maintenue pendant 5 minutes. Une autre augmentation de 20°C/minute jusqu'à 310°C suivait et le programme s'est terminé en maintenant cette dernière température pendant 3 minutes. Des courbes standards pour les quatre HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène) et du standard interne 9-méthylantracène ont été préparées pour permettre une évaluation quantitative de la concentration résiduelle de chaque HAP.

La concentration de HAP dégradé a été calculée par rapport à celle obtenue pour la culture abiotique à chaque période d'incubation où l'extraction avait lieu. Une différence de plus de 20% était jugée significative étant donné l'erreur inhérente à la méthode d'extraction et du GC-FID.

5.2 Cultures liquides

5.2.1 Extraction

L'extraction des HAP des cultures liquides était similaire à celle effectuée pour les microcosmes. Après une acidification du contenu de l'erlenmeyer avec l'ajout de HCl 12N pour atteindre un pH inférieur à 3,0, un volume de 25 mL de éther éthylique a été ajouté. Ce solvant contenait aussi un standard interne, le biphényle (American Chemicals, Montréal), à raison de 150 mg/L. Après l'ajout du solvant, le mélange a été agité une minute et a été transféré dans une ampoule à décantation. La phase solvant a été prélevée et maintenue dans un erlenmeyer propre sur de la glace pour minimiser l'évaporation. Toute émulsion stable entre les phases solvants et aqueuse a été brisée par centrifugation dans un appareil Damon-IEC tel que décrit plus haut. Deux autres ajouts de 10 mL de éther éthylique, ne contenant pas de standard interne, ont été effectués en répétant les étapes d'agitation, de centrifugation (si nécessaire) et de décantation. Tous les volumes d'éther ont été récupérés dans le même erlenmeyer sur glace afin de ralentir l'évaporation de la phase solvant. Le volume final recueilli a été ajusté, dans un ballon jaugé, à 50 mL par ajout de éther éthylique donnant une concentration du standard interne d'environ 75 mg/L. Du Na₂SO₄ anhydre a été ajouté à la phase solvant récupérée pour la déshydrater complètement.

5.2.2 Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

Les analyses des HAP extraits dans le solvant ont été effectuées à l'aide d'une technique similaire à celle déjà décrite. Le programme de température a été modifié pour s'effectuer plus rapidement car les échantillons contenaient beaucoup moins d'hydrocarbures. La température initiale du four était de 70°C. Une augmentation de 20°C/minute s'est effectuée et ce jusqu'à 290°C, puis l'augmentation est passée à 10°C/minute jusqu'à un plateau de 315°C. Ce plateau a été maintenu pendant 13,5 minutes complétant ainsi le programme. Des courbes standards pour les quatre HAP ajoutés et le biphényle ont été préparées pour permettre le suivi de leurs concentrations résiduelles.

La biodégradation des HAP a été suivie exactement comme pour les extraits des microcosmes. Une variation de plus de 20% entre la culture et son contrôle abiotique a été retenue comme un résultat positif.

5.3 Cultures liquides-acétonitrile

5.3.1 Extraction des cultures

Pour quantifier la quantité de chrysène dissous dans les mélanges eau distillée et acétonitrile, des aliquots de 100 µL ont été prélevés des mélanges après que ces derniers aient été filtrés à l'aide d'une membrane pour solvant afin d'enlever tous le chrysène qui a été recristallisé lors de la préparation du mélange. Ces aliquots ont été injectés directement dans l'appareil à chromatographie liquide et soumis au programme décrit dans la prochaine section.

Dans les cultures liquides-acétonitrile, des extractions similaires à celles présentées précédemment pour les cultures liquides ont été effectuées. Les erlenmeyers contenant les cultures ont été acidifiés à un pH inférieur à 3,0 par l'ajout de 1 mL de HCl 12N. Un volume de 20 mL de éther éthylique a ensuite été ajouté. Ce solvant contenait un standard interne, le phénanthrène, à raison de 5 mg/L. Après l'ajout du solvant, l'erlenmeyer a été agité vigoureusement pendant 1 minute. La phase solvant a été prélevée et maintenue dans un erlenmeyer propre. Cette procédure a été répétée à l'aide de deux autres volumes de 10 mL de éther éthylique ne contenant pas de standard interne. Une fois le troisième volume de la phase solvant récupéré dans l'erlenmeyer propre, le solvant a été complètement évaporé sous jet d'azote. Un volume de 20 mL d'acétonitrile de qualité CLHP a ensuite été ajouté à l'erlenmeyer pour resolubiliser les cristaux de chrysène. L'échantillon a été transféré dans des bouteilles de chromatographie de 1 mL (Waters) qui ont été scellées pour prévenir l'évaporation du solvant avant l'analyse.

5.3.2 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Étant donnée la faible concentration du chrysène dans les échantillons et les limites de sensibilité du GC-FID pour les HAP lourds, un protocole d'analyse en CLHP a été

développé pour effectuer les analyses de ces échantillons. L'appareil CLHP utilisé était de marque Waters (Mississauga, Ont.) et comprenait deux pompes de modèle 510 (Waters), un spectrophotomètre Lambda Max, modèle 481 (Waters) et un injecteur automatique de modèle 717 plus (Millipore, USA). Le logiciel d'acquisition de données et d'intégration était le Chromatography Workstation, version 3.3. La colonne hydrophobe utilisée était de type NovaPak C₁₈ et ses dimensions étaient de 3,9 x 150 mm. De l'eau pure filtrée (phase A) et de l'acétonitrile de qualité CLHP (phase B) ont composé la phase mobile. Un ajout de 0.1% (v/v) d'acide acétique glacial (Anachemia) a été effectué dans les deux phases. Le spectromètre a été réglé à une longueur d'onde de 254 nm, jugée optimale pour les composées aromatiques polycycliques, et le débit de la phase mobile dans la colonne était de 2 mL par minute. Un aliquot de 100 µL de chacun des échantillons contenant le chrysène a été injecté. Les pompes ont été programmées pour débiter un mélange constitué de 55% de la phase A et 45% de la phase B. La concentration de la phase B augmentait de façon linéaire pour atteindre un plateau de 100% après 8 minutes. Ce plateau a été maintenu pendant 2 minutes. La concentration de la phase B a ensuite chuté à 45% et a été maintenue pour 2 minutes, complétant ainsi le programme des pompes. Des courbes standards pour le chrysène et le phénanthrène (le standard interne) ont été préparées pour quantifier le chrysène extrait des échantillons. Une variation expérimentale de 20% a été attribuée à cette méthode. Toutes différences inférieures à 20% entre les contrôles et les échantillons ont été jugées non significatives.

5.4 Cultures biphasiques.

5.4.1 Choix du solvant

Afin de choisir le meilleur solvant pour extraire le chrysène de la phase organique de la culture biphasique, des tests de miscibilité entre l'huile de silicone et différents solvants ont été effectués. Cinq éprouvettes contenant chacune 1 mL d'huile de silicone ont été préparées. À chacune de ces éprouvettes a été ajouté 1 mL de solvant organique, soit le éther éthylique, le dichlorométhane, acétate d'éthyle, l'acétonitrile ou le N,N-diméthylformamide. Suite à une agitation vigoureuse de 30 secondes, la présence de deux

phases distinctes a été utilisée pour conclure sur la non miscibilité des solvants avec la phase huile de silicone.

Par la suite, les solvants qui avaient démontré une non miscibilité avec l'huile de silicone ont été testés pour leur capacité de dissolution du chrysène. Des mélanges de solvants et de chrysène de différentes concentrations ont été préparés. Des volumes de 10 mL de solvant ont été ajoutés à des éprouvettes de 15 mL. Des cristaux de chrysène ont été pesés et ajoutés aux éprouvettes à raison de 1, 5 ou de 10 mg de chrysène par éprouvette. Après une agitation vigoureuse de 10 minutes les mélanges ont été laissés au repos pendant 24 heures. La présence de cristaux blancs au fond d'une éprouvette a été considéré comme une sursaturation de chrysène dans le solvant.

5.4.2 Extraction

L'extraction du chrysène de l'huile de silicone s'est effectuée de deux façons. La première méthode n'utilisait qu'un aliquot de 5 mL prélevé de la culture biphasique à extraire après une agitation vigoureuse. L'aliquot a été acidifié à un pH inférieur à 3,0 par l'ajout de HCl 12 N. L'huile a été séparée du milieu liquide par décantation. Ensuite, 1 mL de l'huile décantée a été mélangé à 1 mL d'un solvant (le DMF ou l'acétonitrile). Ces solvants ont été utilisés compte tenu de leur non miscibilité avec l'huile. Le solvant contenait un standard interne, le phénanthrène, à raison de 100 mg/L. Le mélange huile-solvant a été vigoureusement agité pendant 30 secondes et centrifugé à 2000 rpm dans un appareil Damon-IEC pendant 3 minutes. Un aliquot de 1 mL du solvant d'extraction a été prélevé et dilué 10 fois dans le solvant. Ceci servait d'échantillon à analyser.

La deuxième méthode consistait à extraire toute l'huile présente dans la culture biphasique. Pour ce faire, la culture a été acidifiée exactement comme dans la première méthode d'extraction. L'huile et la phase aqueuse ont ensuite été séparées dans une ampoule à décantation de 250 mL. Ensuite 5 mL de solvant ont été ajoutés à l'huile. Le solvant contenait un standard interne, le phénanthrène, à raison de 100 mg/L. L'agitation et la centrifugation du mélange ont été identiques à celles effectuées lors de la première

méthode. Un aliquot de 0,5 mL du solvant d'extraction a été prélevé et dilué 10 fois dans le solvant. Ceci servait d'échantillon à analyser.

5.4.3 Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID)

Dans un premier temps, les extraits des cultures biphasiques ont été analysés au GC-FID selon le même programme que celui utilisé pour les cultures liquides décrites plus haut. Des courbes standards pour le chrysène et le phénanthrène (standard interne) ont été préparées pour quantifier le chrysène résiduel dans les cultures. La concentration de chrysène dégradé dans l'échantillon extrait a été calculée par rapport au chrysène retrouvé dans le contrôle abiotique correspondant. Tout comme précédemment, un écart de plus de 20% entre la culture et le contrôle abiotique a été jugé comme un résultat positif.

5.4.4 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Pour tenter d'améliorer la détection du chrysène parmi les impuretés extraites des cultures biphasiques, des analyses au chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC-MS) ont été effectuées. Les cultures biphasiques ont été extraites au DMF comme indiqué ci-haut et 150 µL ont été injectés dans l'appareil. Le chromatographe en phase gazeuse était un modèle Varian 3500 couplé à un spectromètre de masse Ion Trap 800 (Finnigan, USA). La colonne était de type DB-5 (30 m x 0,3 mm x 0,25 µm). Le gaz porteur était l'hélium. Le débit à la tête de la colonne était de 2,4 mL/min et la pression de 24,7 PSI. Un µL d'échantillon a été injecté en mode "split" et le spectre de masse a été mesuré par balayage répétitif à une vitesse de 1 s/décade de 70 à 400 daltons. Le programme d'intégration était le ITDS version 3.0 (Finnigan). Le four a été programmé pour débiter avec une température initiale de 40°C, puis celle-ci augmentait de 10°C/minute jusqu'à 100°C puis de 3°C/minute jusqu'à 200°C. Ensuite l'augmentation passait à 6°C/minute jusqu'à 290°C et puis de 20°C/minute jusqu'à un plateau de 310°C. Cette température a été maintenue pendant 5 minutes complétant ainsi le programme. L'identification du chrysène et l'évaluation de sa concentration ont été effectuées par comparaison des temps de rétention, du spectre de masse et des aires du

chrysène extrait des cultures avec ceux de courbes standards. Des courbes standards pour le chrysène et le phénanthrène (standard interne), ont été préparées pour permettre cette évaluation. Comme dans la méthode précédente, une comparaison entre le chrysène retrouvé dans l'extrait de la culture et celui du contrôle abiotique correspondant a permis d'établir s'il y avait biodégradation du chrysène.

5.4.5 Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Étant donné qu'il a été impossible de suivre clairement la concentration résiduelle du chrysène dans les cultures biphasiques avec les deux méthodes précédentes, le protocole d'analyse CLHP utilisé pour les cultures liquides-acétonitriles a été adapté aux cultures biphasiques.

5.4.5.1 Détection, calibrage et quantification du chrysène

Des erlenmeyers de 250 mL contenant des mélanges biphasiques composés de 25 mL de milieu BH et de 5 mL d'huile de silicone ont été préparés afin de déterminer si une telle méthode d'analyse au CLHP pouvait permettre d'évaluer la concentration de chrysène extrait d'une culture biphasique, et ce malgré la présence d'impuretés co-extraites. Ces mélanges ont été extraits tel que décrit précédemment. Différentes concentrations de chrysène (0, 1, 2, 5, 10 et 20 ppm) ont été ajoutées à ces mélanges afin de vérifier la capacité du CLHP à quantifier précisément les diverses concentrations de chrysène. Une courbe standard pour le chrysène (avec le phénanthrène comme standard interne) a été préparée pour calibrer l'appareil de chromatographie afin de quantifier le chrysène extrait des mélanges. Ces standards ont été préparés en ajoutant des concentrations précises de chrysène (0, 1, 5, 10, 20, 50 ppm) et de phénanthrène (10 ppm) dans de l'acétonitrile de qualité CLHP et des aliquots de ces solutions ont été injectés dans le CLHP en suivant le même programme que celui utilisé pour les cultures liquides-acétonitrile. Une fois les courbes standards établies, des aliquots de 100 µL des extractions des mélanges biphasiques ont été injectés dans le CLHP en suivant le même programme. Les concentrations de chrysène extraites ont été quantifiées.

5.4.5.2 Analyse des extraits de cultures biphasiques

Une fois qu'un protocole précis d'évaluation de la concentration du chrysène extrait de mélanges biphasiques a été développé et mis au point, les analyses des extractions de cultures biphasiques ont été effectuées. Des aliquots de 100 μ L provenant des extractions de cultures biphasiques ont été injectés au CLHP selon la méthode décrite plus haut. L'appareil de chromatographie a été calibré à l'aide de la même courbe standard effectuée précédemment. Une comparaison entre le chrysène retrouvé dans les cultures extraites et celui dans les contrôles abiotiques correspondants a été effectuée pour calculer le chrysène dégradé dans la culture. Une différence de plus de 20% entre le contrôle abiotique et la culture a été considérée comme un résultat positif étant donné les erreurs inhérentes aux méthodes d'extraction et d'analyses.

6. CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM CHRYSÈNE

6.1 Spectre de pH

Afin d'étudier l'activité de biodégradation du chrysène par le consortium à différents pH, des cultures biphasiques contenant du chrysène, similaires à celles décrites plus haut, ont été préparées. Ces dernières ont été ajustées à chacun des pH suivants : 6,0 ; 6,5 ; 7,0 ; 7,5 et 8,0. Ces cultures ont été inoculées avec 2,5 mL de la culture de maintien du consortium chrysène. Les autres conditions d'incubation ont été les mêmes que pour les cultures biphasiques décrites précédemment. Les pH des cultures ont été ajustés quotidiennement à leur valeur originale par l'ajout de HCl 1N ou de NaOH 0,5N.

Des contrôles abiotiques ont été jumelés à chacune de ces cultures. Ils ont été ajustés au pH correspondant mais ils n'ont pas été inoculés. Ces contrôles ont été extraits et analysés au CLHP selon les méthodes décrites précédemment.

6.2 Spectre de biodégradation des HAP

Afin d'étudier la capacité du consortium bactérien à dégrader des HAP autre que le chrysène, des cultures biphasiques ont été préparées avec ces HAP. Les cultures ont été préparées de façon similaire à celles décrites auparavant. Les HAP ont été ajoutés, à

raison de 100 mg par litre d'huile. Une série de cultures biphasiques a été préparée pour chaque HAP. Les HAP testés étaient le phénanthrène, le pyrène, le chrysène, le benzo(a)pyrène et le pérylène (Aldrich). Les conditions d'incubation ont été les mêmes que pour les cultures biphasiques précédentes.

Des contrôles abiotiques jumelés à chacune des cultures biphasiques ont été préparés de façon similaire à celle utilisée précédemment. Des courbes standards pour le phénanthrène, le pyrène, le benzo(a)pyrène et le pérylène ont été préparées pour calibrer l'appareil de chromatographie. Lors des extractions, un standard interne différent, le 2-méthylnaphtalène, a été utilisé étant donné la présence de phénanthrène dans certaines cultures. Les analyses au CLHP ont été effectuées selon la méthode mentionnée plus haut.

6.3 Analyses microbiologiques.

6.3.1 Dénombrement bactérien

Pour suivre l'évolution de la population bactérienne constituant le consortium chrysène, des séries de dénombrement sur milieu solide ont été effectuées. Pour chaque dénombrement, une série de dilutions a été effectuée à partir d'une culture. Un aliquot de 0,1 mL d'une culture biphasique, vigoureusement agitée, a été prélevé et ajouté à une éprouvette contenant 0,9 mL de milieu BH stérile. Après 30 secondes d'agitation, un aliquot de 0,1 mL a été transféré de l'éprouvette à une autre contenant 0,9 mL de milieu BH stérile. Cette opération a été répétée quatre fois de plus pour donner une série de dilution allant de 10^{-1} à 10^{-6} . Un aliquot de 0.1 mL de chacune de ces dilutions a été étalé sur des géloses «Plate Count Agar». Ces géloses ont été incubées à 30°C pendant 48 à 72 heures et les colonies macroscopiquement différentes ont été dénombrées.

6.3.2 Coloration Gram

Pour observer les différentes formes bactériennes retrouvées dans les cultures, des colorations de type Gram ont été effectuées à partir des différentes cultures biphasiques. Une trousse de coloration Gram en trois étapes (Difco) a été utilisée. Sur une lame de

microscope nettoyée, une goutte de culture biphasique a été déposée puis étalée et séchée. Après avoir fixé les microorganismes sur la lame en la chauffant à la flamme pendant quelques secondes, celle-ci a été recouverte avec la solution de violet de cristal de la trousse. Après une minute, cette solution a été rincée avec une solution d'iode puis la lame a été recouverte de cette dernière solution pour une autre minute. Après avoir rincé la lame à l'eau, une dernière solution composée d'alcool et de safranine a été appliquée sur la lame pour 30 secondes. La lame a ensuite été rincée et asséchée. L'observation a été effectuée sous immersion d'huile, à l'aide d'un microscope optique.

6.3.3 Vaporisation de HAP sur des géloses

La vaporisation des HAP sur des géloses a été utilisée pour vérifier, de façon rapide, si une souche bactérienne isolée pouvait oxyder certains HAP. Les souches à tester ont d'abord été inoculées sur des géloses BH (1,5% agar Noble) additionnées de 0,05% (p/v) d'extrait de levures de façon à retrouver des colonies distinctes et espacées. Après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, la surface des géloses a été recouverte d'un très mince film de HAP par vaporisation de fines gouttelettes d'une solution d'acétone de qualité CLHP (Anachemia) contenant le HAP désiré. Les HAP utilisés étaient le phénanthrène en solution 2% (p/v), le pyrène à 1% (p/v) et le chrysène à 0.1% (p/v). Une fois vaporisées, les géloses ont été incubées à 37°C pendant 1 à 2 semaines et elles ont été vérifiées périodiquement pour l'apparition de halos ou de pigments autour des colonies.

Résultats

1. CULTURES BACTÉRIENNES

1.1. Microcosmes

Des cinétiques de biodégradation du fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène en microcosmes ont été effectuées (Figure 4). Dans les contrôles abiotiques, seulement la concentration du fluorène a diminué de façon significative, probablement car ce HAP est relativement volatil par rapport aux 3 autres (Figure 4A). Plus de 80 ppm (mg/kg) de fluorène se sont volatilisés de ces microcosmes après 160 jours d'incubation, soit environ la moitié du fluorène présent au départ. Les concentrations de phénanthrène, de pyrène et du chrysène n'ont pas diminué de façon significative tout au long de l'incubation des contrôles abiotiques même s'il y a eu des variations importantes, dans certains cas, dues aux méthodes d'extraction et de dosage. Dans les microcosmes biotiques, le fluorène et le phénanthrène ont été éliminés presque complètement après 30 jours d'incubation (Figure 4B). Environ 110 ppm de fluorène et de phénanthrène ont été dégradés durant ces 30 jours par la microflore de la sablière Thouin en comparant avec les contrôles abiotiques correspondants. Le pyrène et le chrysène ont été éliminés plus lentement puisque 150 jours d'incubation ont été nécessaires pour leur disparition presque complète. Environ 130 ppm de pyrène et 90 ppm de chrysène ont été dégradés durant cette période.

Un repiquage de ces cultures a été effectué dans une nouvelle série de microcosmes (Figure 5). Pour chaque nouveau microcosme, l'inoculum était composé de 10 mL d'un mélange sol et milieu provenant de la culture précédente. Cet inoculum a été ajouté à 40 g de sol de la sablière contaminé dans des erlenmeyers contenant du milieu Bushnell Haas liquide frais (Figure 5C). Ces cultures inoculées étaient similaires aux microcosmes précédents sauf qu'ils ne contenaient pas de fluorène. Donc, deux paramètres ont été changés, soit l'utilisation d'un inoculum et l'absence du plus léger des 4 HAP. Des contrôles abiotiques (Figure 5A) et des microcosmes non inoculés contenant seulement le sol de la sablière contaminée (Figure 5B), ont été préparés en parallèle. La concentration des HAP dans les microcosmes abiotiques n'a pas varié de façon significative tout au long de l'incubation. Dans les cultures inoculées et non-inoculées, environ 100 ppm de

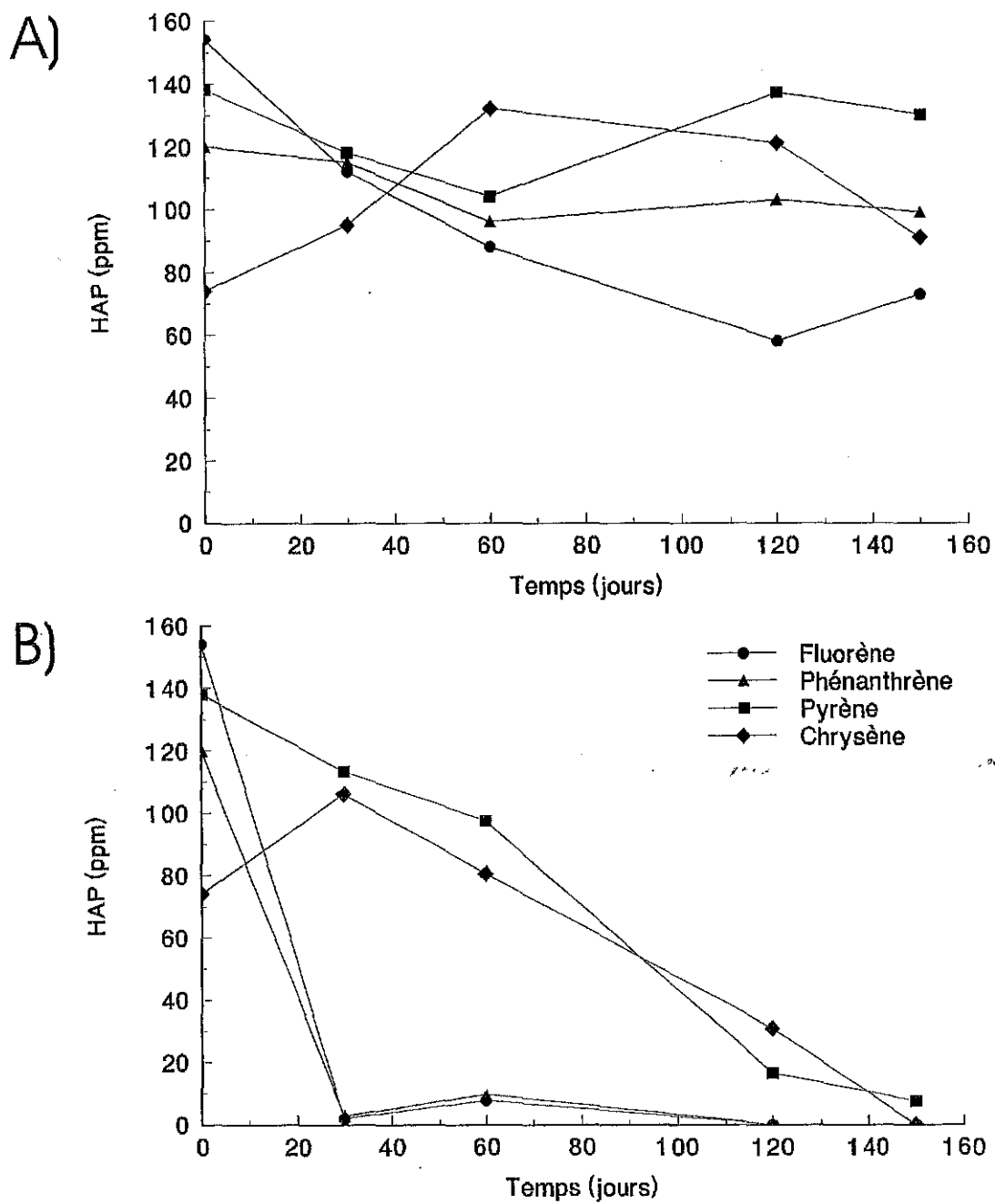
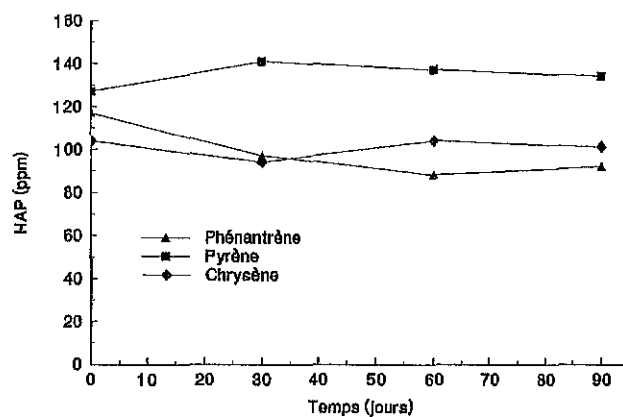
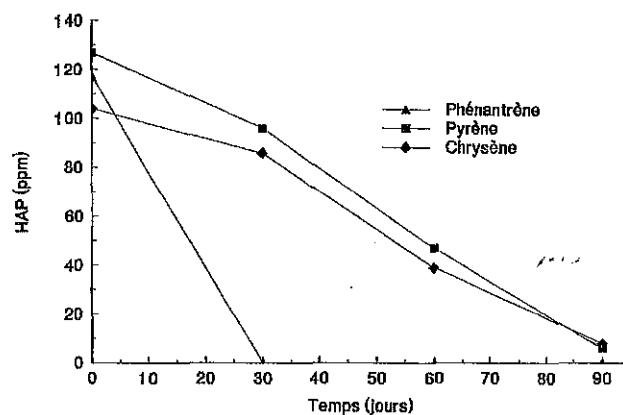


Figure 4. Biodégradation de HAP en microcosmes, par la flore indigène de la sablière Thouin. A) Contrôles abiotiques B) Cultures biotiques

A)



B)



C)

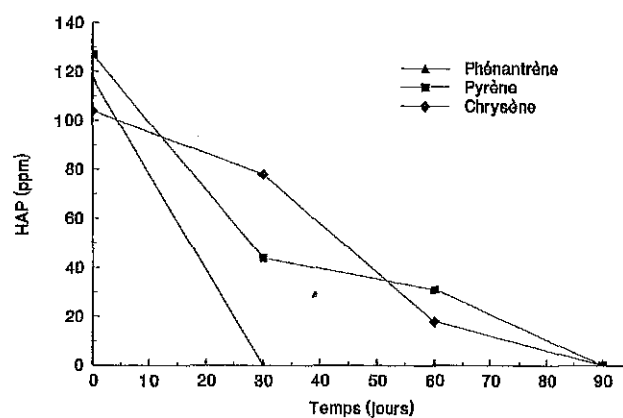


Figure 5. Biodégradation de HAP en microcosmes par la microflore indigène de la sablière Thouin. a) Contrôles abiotiques b) Cultures non-inoculées c) Cultures inoculées

phénanthrène ont été dégradés après 30 jours ou moins. Dans ces cultures non-inoculées, environ 130 ppm de pyrène et 110 ppm de chrysène ont été dégradés en 90 jours, soit 60 jours de moins que dans la première expérience (Figure 4).

Dans les cultures inoculées, plus de 90 ppm de pyrène ont été dégradés en 30 jours par rapport à 40 ppm dans les cultures non-inoculées. La différence est devenue moindre au 60^{ème} jour avec une dégradation totale du pyrène de 110 ppm dans les cultures inoculées et 90 ppm dans celles non-inoculées. Pour la dégradation du chrysène, la différence entre les deux cultures est moins importante. Après 60 jours d'incubation, plus de 80 ppm de chrysène ont été dégradés dans la culture inoculée par rapport à 60 ppm dans celle non-inoculée. Ces cultures n'ayant pas été effectuées en triplicata, les différences observées entre les cultures non-inoculées et inoculées n'ont pas été considérées comme étant significatives.

1.2. Cultures liquides

Compte tenu de la complexité physico-chimique des microcosmes, il a été résolu d'utiliser des milieux liquides car ces derniers permettent d'étudier la biodégradation des HAP dans un environnement plus simple. Sous conditions abiotiques, une baisse de la concentration des 4 HAP a été observée (Figure 6A). Après 60 jours d'incubation cette baisse s'est élevée à plus de 85 ppm pour le fluorène, 80 ppm pour le phénanthrène, 30 ppm pour le pyrène et 20 ppm pour le chrysène. Ces baisses sont jugées significatives sauf dans le dernier cas.

Malgré ces baisses de concentration, les cultures biotiques ont montré une biodégradation de certains HAP (Figure 6B). Au 30^{ème} jour d'incubation, le fluorène et le phénanthrène ont presque complètement disparu des cultures. Par comparaison avec les pertes observées dans les contrôles abiotiques correspondants, plus de 45 ppm de fluorène et 60 ppm de phénanthrène ont été dégradés par les microorganismes au cours des 30 premiers jours d'incubation. Après 30 et 60 jours d'incubation, une biodégradation du pyrène a été observée. En tenant compte des pertes obtenues dans les contrôles, entre 30 et 35 ppm de pyrène ont été dégradés par la population bactérienne

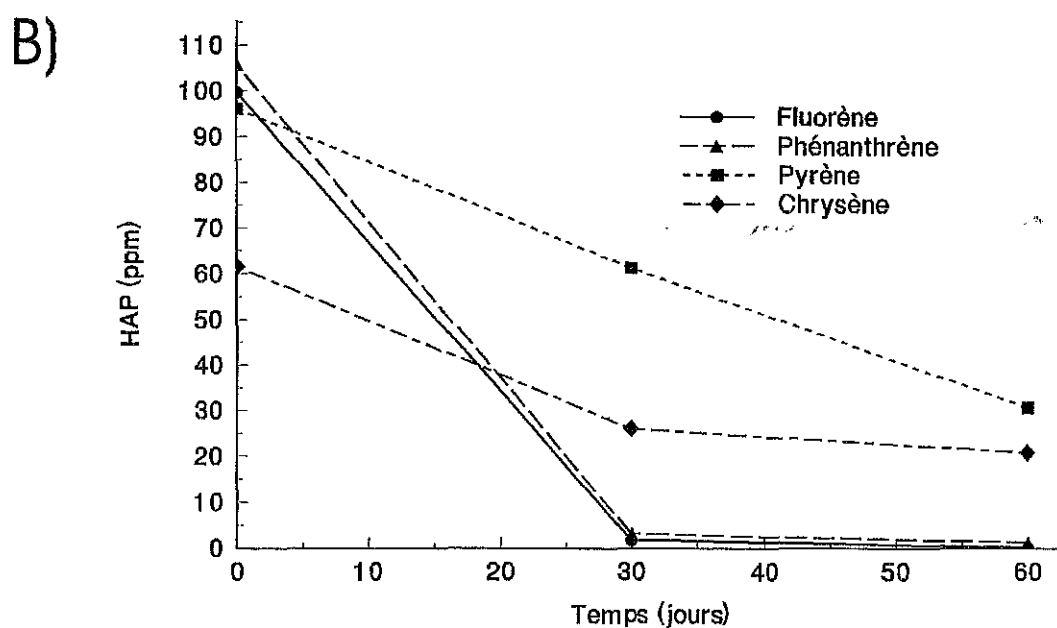
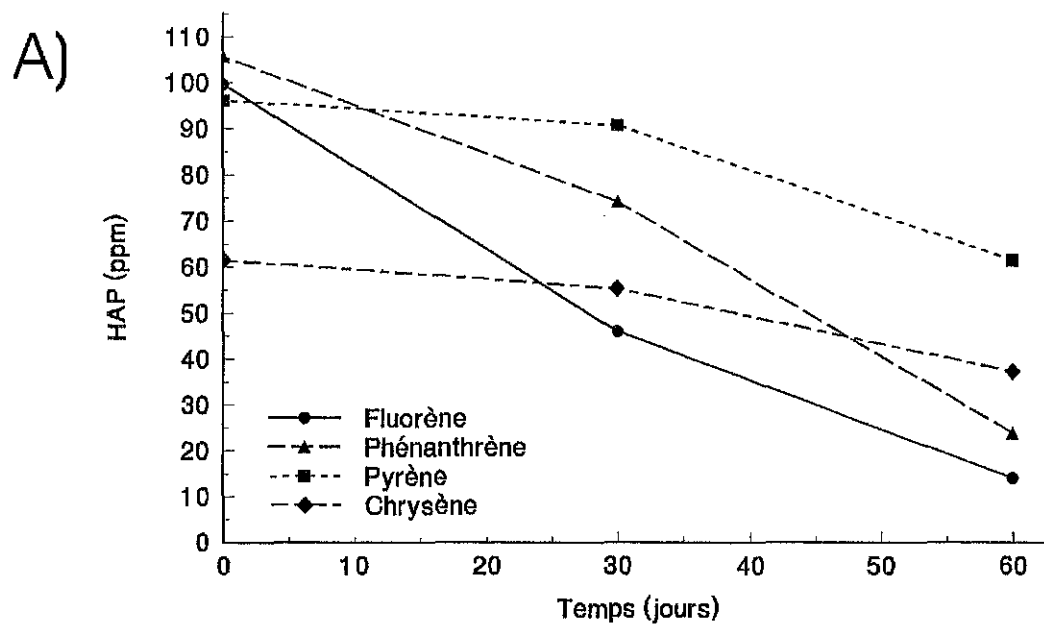


Figure 6. Biodégradation des HAP, en cultures liquides, par la microflore indigène isolée de la sablière Thouin. A) Contrôles abiotiques
B) Cultures biotiques

après ces périodes d'incubation, respectivement. Une diminution non significative de 20 ppm ou moins de chrysène a été observée par rapport aux contrôles aux différents points d'échantillonnages. Les importantes pertes observées dans les contrôles abiotiques n'ont pas permis de poursuivre l'incubation de ces cultures. Il a donc été impossible d'observer si ce type de culture permettait la biodégradation du chrysène.

1.3. Pertes de HAP dans les contrôles abiotiques

1.3.1 Dénombrement des contrôles abiotiques

Pour tenter d'expliquer les pertes de HAP dans les cultures liquides abiotiques, des dénombrements bactériens ont été effectués. Des aliquots de chacun des contrôles abiotiques ont été prélevés et les dénombrements ont été effectués. Malgré l'utilisation de différents milieux de croissance (BHY 0,05% et 0,5% (p/v), PCA et Tryptic Soy Agar), aucune croissance bactérienne n'a été détectée dans les contrôles abiotiques, suggérant que les pertes de HAP seraient attribuables à d'autres facteurs que leur dégradation par des microorganismes.

1.3.2 Recouvrement des HAP

Pour vérifier si les pertes enregistrées dans les cultures abiotiques étaient causées par la méthode d'extraction ou d'analyse, des extractions de milieux liquides contenant des concentrations précises des 4 HAP ont été effectuées. Quatre échantillons ont été préparés. Chaque échantillon contenait soit 50, 100, 250 ou 500 ppm de chacun des 4 HAP. Ces échantillons ont été analysés selon la méthode utilisée pour les cultures liquides, en évaluant la concentration des HAP extraits par l'entremise d'un appareil GC-FID. Pour vérifier si les pertes étaient dues à des baisses de sensibilité de l'appareil d'analyse, les échantillons ont été analysés sur un appareil équipé, d'une part, d'une colonne neuve (Figure 7) et d'autre part d'une colonne utilisée depuis plus de 6 mois (Figure 8).

Lorsque les analyses ont été effectuées avec un appareil GC-FID équipé d'une colonne neuve, les HAP ont été presque entièrement récupérés. Pour les concentrations

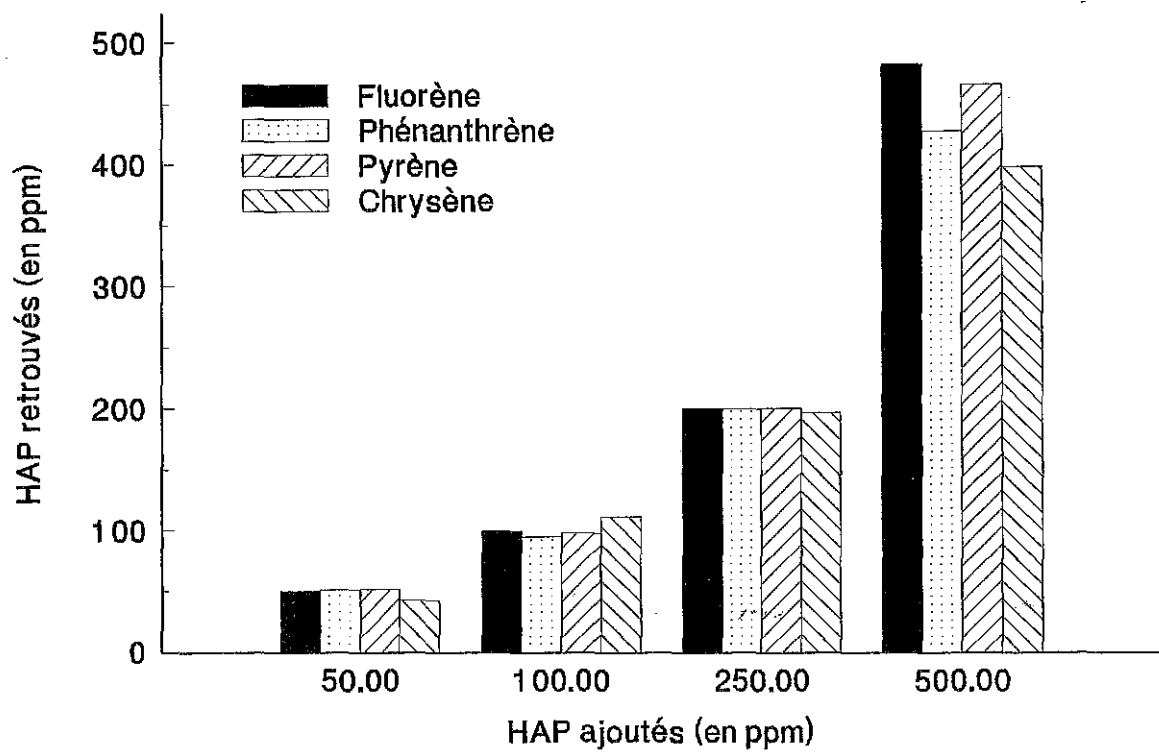


Figure 7. Recouvrement des HAP extraits de milieux liquides et analysés par GC-FID équipé d'une colonne neuve.

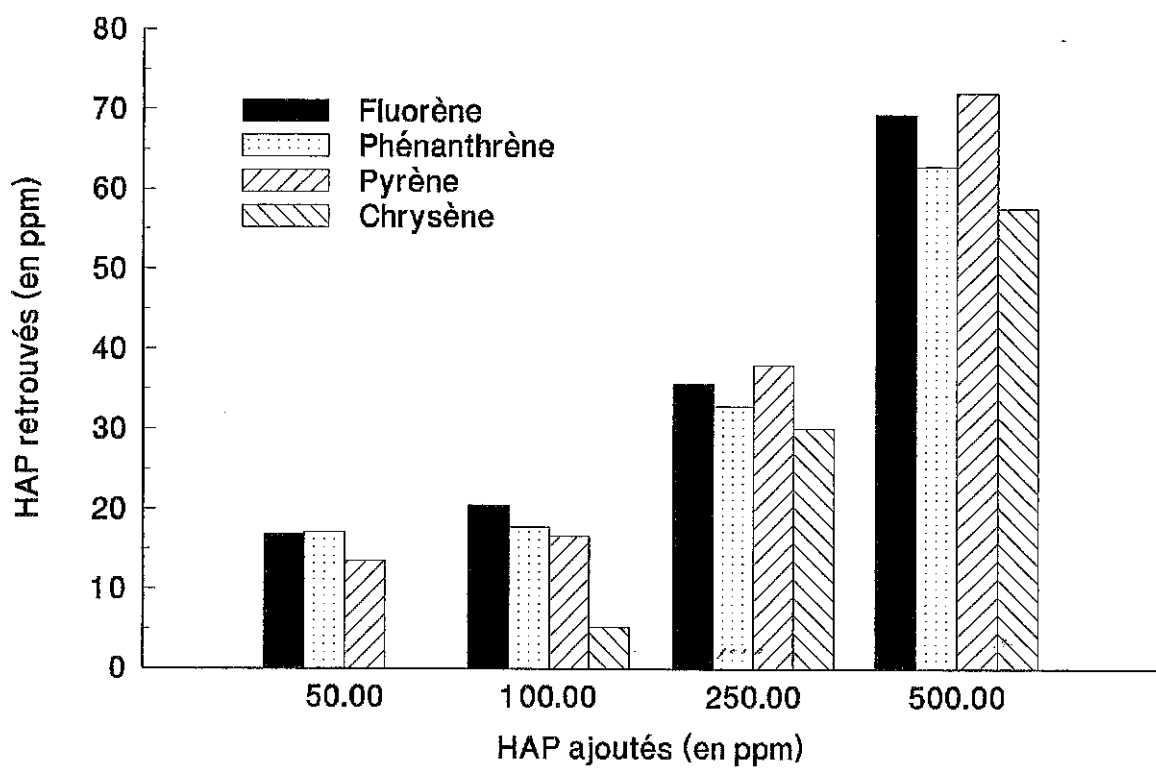


Figure 8. Recouvrement des HAP extraits de milieux liquides et analysés par GC-FID équipé d'une colonne utilisée depuis plus de 6 mois.

de HAP ajoutées aux milieux liquides entre 50 et 250 ppm, le recouvrement a été pratiquement total (Figure 7). Pour les échantillons contenant 500 ppm de chacun des 4 HAP, des pertes pour 3 d'entre eux ont été observées. Les concentrations retrouvées étaient de 430 ppm de phénanthrène, 470 ppm de pyrène et 400 ppm de chrysène. C'est donc dire que pour les concentrations normalement utilisées dans les cultures liquides (100 ppm), il n'y a pas eu de pertes de HAP lorsque la colonne était neuve.

Lorsque les analyses des mêmes échantillons ont été effectuées avec le même appareil équipé d'une colonne qui avait été utilisée pendant plus de 6 mois, une forte baisse de la sensibilité de l'appareil a été observée. C'est-à-dire que de fortes baisses de la concentration des HAP ont été enregistrées dans les extraits des milieux (Figure 8). Pour les milieux ayant reçu 50 ppm, moins de 50% de la concentration de chacun des 4 HAP a été récupérée dans les extraits. De plus, le chrysène n'a pas été détecté lorsque des concentrations inférieures à 100 ppm ont été injectées dans l'appareil GC-FID. Dans les extraits provenant des cultures auxquels 100 ppm ont été ajoutés, environ 20 ppm de fluorène, de phénanthrène et de pyrène et seulement 5 ppm de chrysène ont été retrouvés. Pour les 2 autres concentrations (250 et 500 ppm) ajoutées aux milieux, les taux de recouvrement des HAP se sont chiffrés autour de 10 à 20%. Ceci semble indiquer que la colonne du GC-FID a perdu, après plus de 6 mois d'utilisation, sa sensibilité aux HAP et est devenue inutilisable pour suivre les concentrations de HAP dans les cultures.

Les résultats présentés à la Figure 6, où les premières pertes de HAP dans les contrôles abiotiques des cultures liquides ont été observées, provenaient d'analyses effectuées avec la même colonne et ce 2 à 3 mois auparavant. Lors de la première série d'extraction à T_0 la majeure partie des HAP a été récupérée. Mais des pertes importantes ont été observées après le 30^{ème} et 60^{ème} jour. Ceci semble indiquer que les baisses observées dans les contrôles abiotiques des différentes cultures liquides étaient probablement attribuables au vieillissement rapide de la colonne de l'appareil de chromatographie. De plus, l'appareil était constamment utilisé pour l'analyse d'extraits de sols contaminés, ce qui a pu expliquer cette perte de sensibilité rapide.

1.4 Cultures liquides-acétonitrile

1.4.1 Solubilité du chrysène dans une solution eau-acétonitrile

Des solutions de différentes concentrations d'acétonitrile sursaturées de chrysène ont été préparées, filtrées et analysées à l'aide d'un appareil CLHP (Tableau 6). Cette méthode d'analyse a permis d'évaluer à environ 100 ppm la concentration de chrysène dissous dans la solution d'acétonitrile saturée de chrysène. Des concentrations détectables de chrysène ont été retrouvées dans les solutions contenant 5% (v/v) et plus d'acétonitrile. En deçà de cette concentration en solvant, l'appareil n'a pas été assez sensible pour détecter le chrysène présent dans ces solutions. Le seuil minimum de détection de chrysène dissous a été établi à 1 ppm dans une solution à 5% de solvant par volume de milieu liquide.

1.4.2 Tolérance des microorganismes à l'acétonitrile

Des tests de dénombrement pour évaluer la tolérance des bactéries à différentes concentrations d'acétonitrile dans leur milieu ont été effectués (Tableau 7). Une chute rapide du nombre de bactéries a été observée à mesure que la concentration d'acétonitrile augmentait. Aucune croissance n'a été détectée dans les cultures contenant plus de 5% (v/v) d'acétonitrile. De plus, le nombre de souches macroscopiquement différentes a aussi beaucoup diminuée à mesure que la concentration d'acétonitrile augmentait. Malgré la perte de la majeure partie des souches, la concentration de solvant retenue pour les cultures liquide-acétonitrile a été de 5% car c'était la concentration minimale où il a été possible de détecter le chrysène dissous.

1.4.3 Biodégradation

Des cultures liquide contenant 5% (v/v) d'acétonitrile et environ 1mg de chrysène dissous par litre de milieu liquide ont été préparées. Des échantillons ont été extraits à chaque jour pendant 5 jours, mais aucune biodégradation du chrysène n'a été observée étant donné que des concentrations de chrysène d'environ 1 ppm ont été retrouvées dans tous les échantillons. De plus, aucune turbidité ne s'est développée dans les cultures, ce

Tableau 6 : Évaluation de la concentration du chrysène dissous dans des solutions eau-acétonitrile par chromatographie liquide de haute performance (en duplicata)

Solutions eau-acétonitrile (en % acétonitrile v/v)	Chrysène dissous dans les solutions (en ppm)	
	Échantillon 1	Échantillon 2
0	-	-
0,5	-	-
1	-	-
5	1,4	0,6
10	5,6	4,2
20	15,1	12,2
100	84,6	112,3
(acétonitrile saturée de chrysène)		

Tableau 7 : Dénombrement des bactéries indigènes de la sablière contaminée après 48 heures d'incubation en présence de différentes concentrations d'acétonitrile

% d'acétonitrile	Dénombrement (en UFC/ml)	Nombre de souches macroscopiquement différentes
0	$6,8 \times 10^8$	8-9
0.5	$8,4 \times 10^6$	5
1	$5,4 \times 10^6$	5
5	$3,2 \times 10^4$	2
10	$< 10^3$	0
20	$< 10^3$	0

qui a suggéré une absence de croissance bactérienne. Finalement, des cristaux blancs, fort probablement des cristaux de chrysène, sont apparus sur les parois de la bouteille dès la deuxième journée. Ceci a indiqué qu'une précipitation du chrysène dissous dans la culture avait eu lieu, probablement due à une évaporation de l'acétonitrile de la culture, et ce malgré l'utilisation de bouchons pour sceller les bouteilles. Une reprise de ces cultures a montré des résultats similaires. Il semble donc qu'une culture contenant une solution d'acétonitrile saturée de chrysène n'ait pas permis l'observation d'une biodégradation du chrysène avec les méthodes d'analyses utilisées.

1.5 Cultures biphasiques

1.5.1 Mises au point analytiques

Avant de pouvoir effectuer des cinétiques de biodégradation du chrysène en cultures biphasiques, il a fallu mettre au point la méthode d'analyse quantitative du chrysène une fois ce dernier extrait des cultures. En premier lieu, l'utilisation du N,N diméthylformamide (DMF) comme solvant d'extraction se voulait une méthode qui limiterait l'extraction des impuretés tout en extrayant tout le chrysène présent dans l'huile de silicone. De l'huile de silicone contenant des concentrations connues de chrysène dissous a été extraite et un échantillon des extraits a été injecté dans un GC-FID dans le but de tracer une courbe standard. L'évaluation de la concentration du chrysène dans les échantillons a été impossible car une très grande quantité d'impuretés, dont certaines possédant le même le temps de rétention que le chrysène, ont été extraites de l'huile malgré l'utilisation du DMF. De plus, l'intérieur de la colonne du GC-FID contenait 95% (v/v) de diméthyl polysiloxane, le même composé que l'huile de silicone, ce qui a été considéré comme potentiellement dommageable.

Pour tenter d'éviter l'extraction de ces impuretés, d'autres solvants ont été considérés tel que le diéthyl éther, le dichlorométhane et l'éthyl acétate. Ces trois solvants se sont tous avérés miscibles avec l'huile, ne formant qu'une seule phase, rendant irréalisable toute extraction du chrysène. Seul le DMF et l'acétonitrile se sont avérés être des solvants organiques non miscibles à l'huile et efficaces dans l'extraction du chrysène. Par contre le chrysène est moins soluble dans l'acétonitrile que dans le DMF,

et les échantillons extraits à l'acétonitrile contenait autant, sinon plus, d'impuretés que ceux effectués par le DMF. Le DMF a donc été considéré comme solvant de choix pour l'extraction des cultures biphasiques mais la méthode d'analyse au GC-FID ne s'avérait plus acceptable.

Afin d'évaluer la concentration du chrysène malgré la présence d'impuretés extraites de l'huile, des analyses au GC-MS ont été entreprises. Des problèmes similaires à ceux liés à l'utilisation du GC-FID ont été rencontrés. Malgré une colonne de composition différente ainsi qu'une méthode d'analyse différente, la séparation du chrysène et des impuretés a été impossible étant donné une concentration relativement importante de ces dernières par rapport au chrysène et des temps de rétention pratiquement identiques. De plus, en balayant la région du spectre de masse devant contenir le chrysène, plusieurs silicones ayant une masse très proche du chrysène ont été retrouvés. Ceci rendait l'évaluation de la concentration du chrysène pratiquement impossible.

Les résultats obtenus lors des analyses des solutions d'acétonitrile (Tableau 6), où une évaluation assez précise de petites concentrations de chrysène a été possible, ont montré le potentiel intéressant de la chromatographie liquide de haute performance. L'application d'un protocole semblable de CLHP pour analyser les échantillons extraits des cultures biphasiques a semblé fort intéressante. L'évaluation de la concentration du chrysène dans des extraits (au DMF) de solutions biphasiques contenant des concentrations connues de chrysène a été effectuée (Tableau 8). Cette méthode s'est avérée très précise car les concentrations de chrysène détectées correspondaient à une différence de moins de 20% des concentrations de chrysène ajoutées aux solutions biphasiques (avant l'extraction). Cette méthode d'analyse s'est avérée très précise pour la quantification d'échantillons contenant entre 5 et 10 ppm de chrysène. Les échantillons ont dès lors été dilués de façon à ce que les concentrations de chrysène à analyser soient situées dans cet intervalle. Donc, un protocole d'analyse quantitative efficace a pu être développé, testé et appliqué aux cultures biphasiques.

Tableau 8 : Évaluation de la concentration du chrysène extrait de solutions biphasiques (eau/huile de silicone) par chromatographie liquide de haute performance (en triplicata)

Concentration du chrysène (en ppm) dans les solutions biphasiques	Chrysène récupéré lors des extractions au DMF (en ppm) Échantillon		
	1	2	3
0	0	0	0
1	0,7	1,5	0,6
2	1,8	1,7	1,9
5	4,8	5,1	4,8
10	9,8	11,4	10,5
20	17,5	16,6	19,3

1.6 Biodégradation du chrysène par la microflore indigène isolée de la sablière.

Pour déterminer si les bactéries indigènes isolées de la sablière contaminée pouvaient utiliser le chrysène comme unique source de carbone, des cinétiques de biodégradation du chrysène (100 mg/ L d'huile de silicone) en cultures biphasiques ont été effectuées (Figure 9). Aucune perte de chrysène n'a été enregistrée dans les contrôles abiotiques au cours de l'incubation. Une biodégradation significative du chrysène a été observée dès le 7^{ème} jour d'incubation avec un enlèvement d'environ 35 ppm. Le taux de dégradation est resté constant pendant les 21 premiers jours d'incubation pour atteindre une concentration résiduelle d'environ 10 ppm de chrysène après cette période.

Une autre série de cultures biphasiques a été effectuée pour vérifier la possibilité d'accélérer la biodégradation du chrysène en utilisant un milieu de culture plus riche comme phase aqueuse. Du milieu BH enrichi d'extrait de levure à 0,05% (p/v) a été utilisé dans certaines cultures et la biodégradation du chrysène dans ces cultures biphasiques a été comparée à d'autres n'ayant que le chrysène comme source de carbone (Figure 10). Aucune différence significative (plus que 20 ppm) dans la biodégradation du chrysène n'a été observée dans ces cultures. Une dégradation d'environ 90 ppm de chrysène a été observée après 28 jours d'incubation de chacune des cultures. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque cette expérience a été répétée.

1.7 Repiquages des cultures biphasiques

Pour établir une culture biphasique de maintien contenant une population bactérienne active provenant de la microflore indigène de la sablière, il a fallu démontrer que ces cultures pouvaient être repiquées dans des milieux frais contenant du chrysène et qu'elles conservaient leur capacité d'utiliser ce HAP comme unique source de carbone. La Figure 11 montre qu'après le premier repiquage de la population bactérienne, l'activité de biodégradation a été conservée. La dégradation du chrysène est restée constante pour atteindre environ 90 ppm après 28 jours d'incubation. Cette culture a été repiquée dans une nouvelle série de cultures biphasiques et la biodégradation a continué d'être suivie.

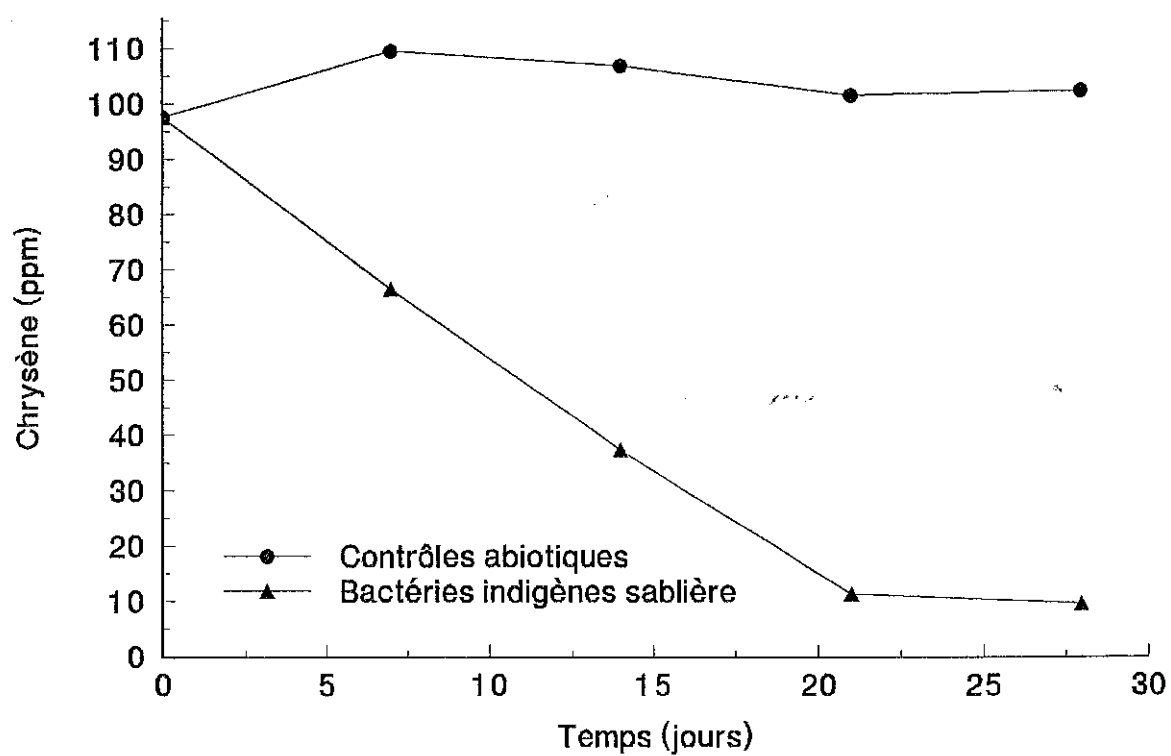


Figure 9. Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques, par les bactéries indigènes isolées de la sablière Thouin.

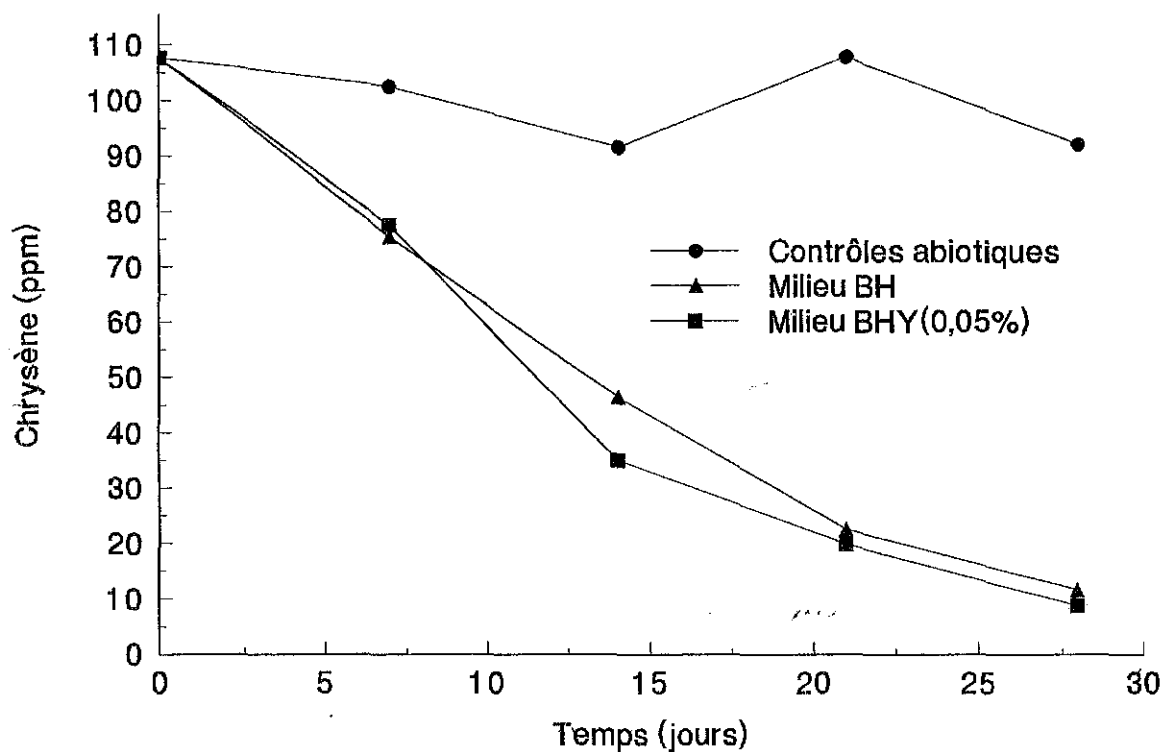


Figure 10. Comparaison de la composition des milieux de cultures sur la biodégradation du chrysène en cultures biphasiques. BH: milieu Bushnell-Hass. BHY: milieu Bushnell-Hass additionné de 0,05% (p/v) d'extrait de levures.

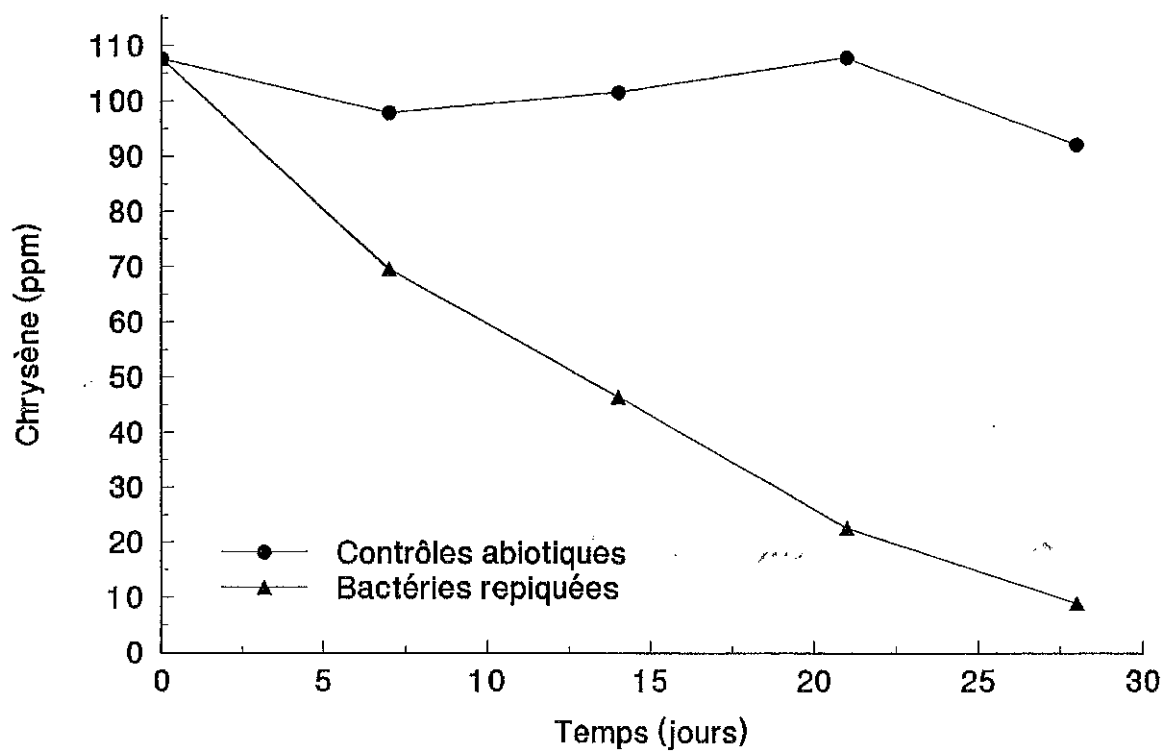


Figure 11. Biodégradation du chrysène, en culture biphasique, par une population bactérienne repiquée d'une culture biphasique active.

Ces repiquages ont été répétés à toutes les deux semaines et la biodégradation a été suivie de façon régulière. Au bout de 5 repiquages, la population bactérienne était encore active quoiqu'un peu plus lente (Figure 12). Après 42 jours d'incubation, environ 80 ppm de chrysène ont été dégradés. La fréquence de repiquage des cultures a été maintenue à 2 semaines. La dégradation presque complète du chrysène a été obtenue entre 21 et 42 jours d'incubation pour la majeure partie des cultures de maintien effectuées.

2. CULTURES CHAMPIGNONS

2.1 Microcosmes

Des microcosmes préparés afin d'encourager la croissance des champignons de la sablière Thouin tout en tentant d'inhiber la microflore bactérienne ont été utilisés afin de déterminer la cinétique de biodégradation de 4 HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène). Des pertes significatives des 4 HAP ont été observées dans les contrôles abiotiques tel que révélé par les analyses au GC-FID. En 45 jours d'incubation, plus de 50 ppm de fluorène et de phénanthrène ont disparu. Sur les 75 ppm de pyrène extrait au tout début de l'incubation, moins de 55 ont été retrouvés après 45 jours d'incubation, indiquant une perte de 20 ppm. Finalement, seulement 43 ppm de chrysène sur les 100 ajoutés ont été retrouvés au début de l'incubation et environ 10 ont été détectés au 45^{ème} jour (données non présentées). Tel que décrit dans une section précédente, une bonne partie de ces pertes a été attribuée à la baisse de sensibilité du GC-FID au HAP en fonction de l'usure de la colonne hydrophobe utilisée.

De plus, d'importantes augmentations de pH ont été observées dans toutes les cultures biotiques lors de ces expériences. Des ajustements, souvent 2 fois par jour, ont été effectués afin de conserver un pH acide pour encourager la croissance des champignons au détriment de la population bactérienne. Après 42 jours d'incubation des étalements d'aliquots de ces cultures sur des géloses PCA ont été effectués et ont montré la présence de plus de 10^8 unités formatrices de colonies par mL d'aliquot, dénotant une présence importante de bactéries malgré l'addition d'antibiotiques et un pH acide. Ceci ne nous a pas permis de conclure sur la biodégradation de HAP par les champignons indigènes de la sablière contaminée.

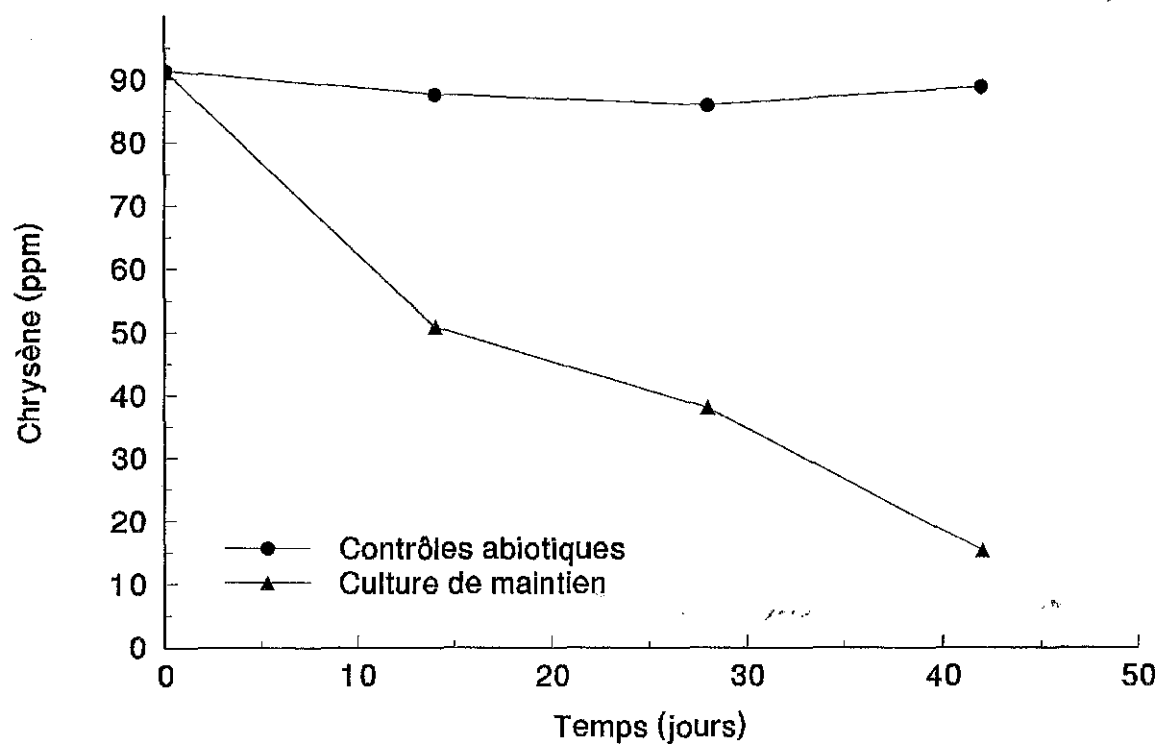


Figure 12. Biodégradation du chrysène, en culture biphasique, par la culture bactérienne de maintien après le 5^{ème} repiquage.

2.2 Cultures liquides champignons

Des cultures liquides favorisant la croissance des champignons et inhibant la croissance bactérienne ont été préparées. Des aliquots de ces cultures ont été étalés sur des géloses PCA de façon régulière et ont permis de démontrer l'absence de toute croissance bactérienne. Comme c'était le cas pour les cultures liquides bactériennes (Figure 6), des pertes significatives des 4 HAP ont été observées dans les contrôles abiotiques (Figure 13A). De plus, seulement 45 ppm de chrysène ont été obtenus lors de la première extraction, au début de l'incubation. Après 45 jours d'incubation, des pertes de 35 ppm de fluorène, de phénanthrène et de chrysène ont été observées. Des pertes non significatives (≈ 15 ppm) ont aussi été observées pour le pyrène. Dans les cultures liquides (Figure 13B), une dégradation significative a été observée pour le fluorène et le phénanthrène. Après 30 jours d'incubation, une différence de plus de 60 ppm de fluorène et 65 ppm de phénanthrène entre le contrôle abiotique et la culture liquide a été constatée. Après le même temps d'incubation, une différence de 20 ppm de pyrène a aussi été observée mais elle n'a pas été considérée significative. Aucune différence significative n'a été observée pour le chrysène car seulement 10 ppm ont été récupérés dans le contrôle abiotique et la culture.

2.3 Cultures biphasiques champignons

Afin de simplifier la matrice complexe des microcosmes, d'éliminer toute croissance bactérienne au profit des champignons ainsi que les pertes de HAP observées dans les microcosmes et les cultures liquides abiotiques, des cultures biphasiques ajustées à pH acide, contenant du chrysène et un cocktail d'antibiotiques ont été préparées (Figure 14). Au bout de 56 jours d'incubation, aucune perte n'a été observée dans les contrôles abiotiques. De plus, les champignons n'ont pas effectué une biodégradation significative du chrysène étant donné que la concentration résiduelle après 56 jours d'incubation était de 95 ppm. Des reprises de cette expérience ont démontré des résultats similaires. C'est-à-dire que sous nos conditions, aucune dégradation du chrysène n'a été effectuée par les champignons indigènes de la sablière Thouin.

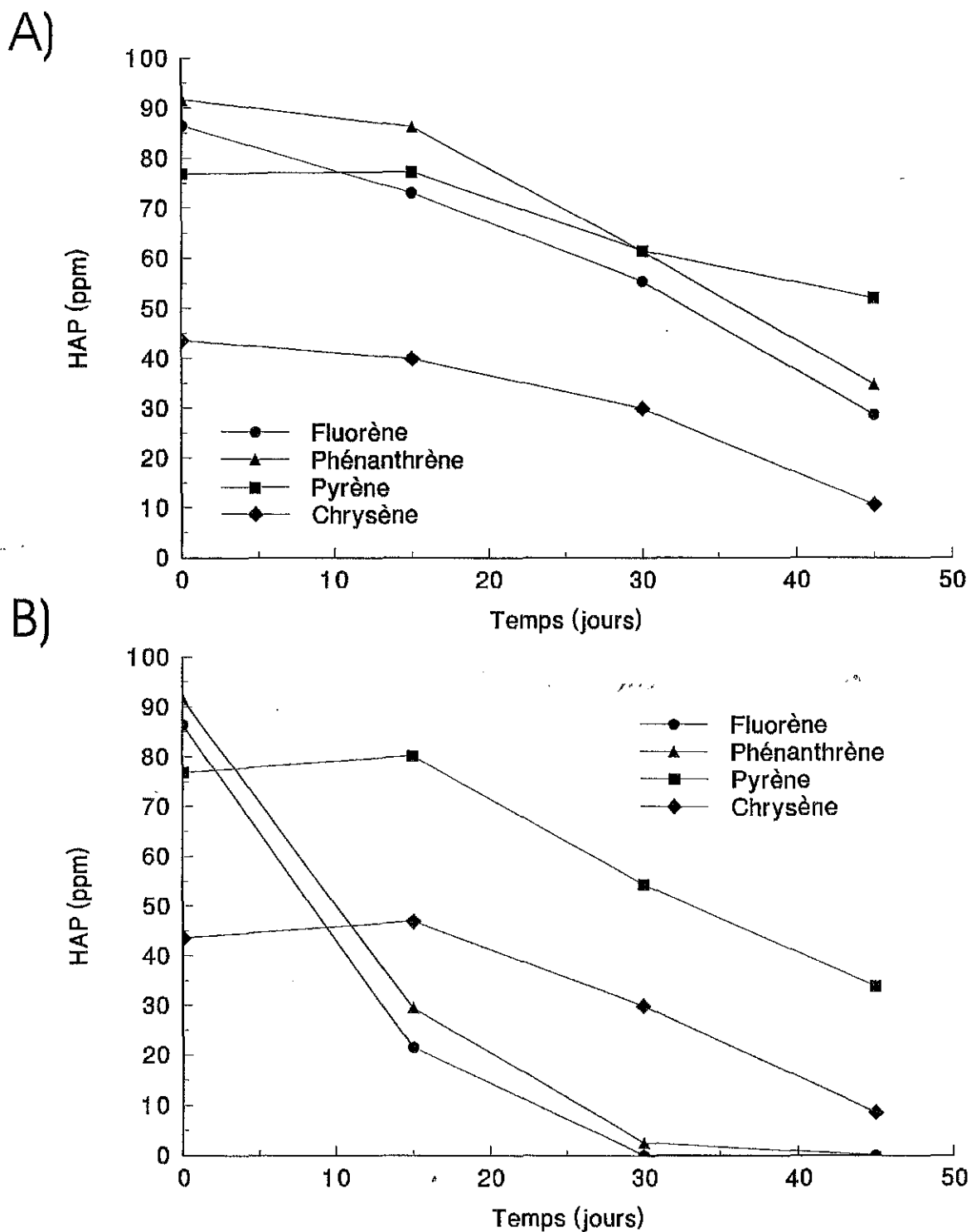


Figure 13. Biodégradation des HAP, en cultures liquides, par les champignons indigènes de la sablière Thouin. Analyses effectuées au GC-FID.
A) Contrôles abiotiques B) Cultures

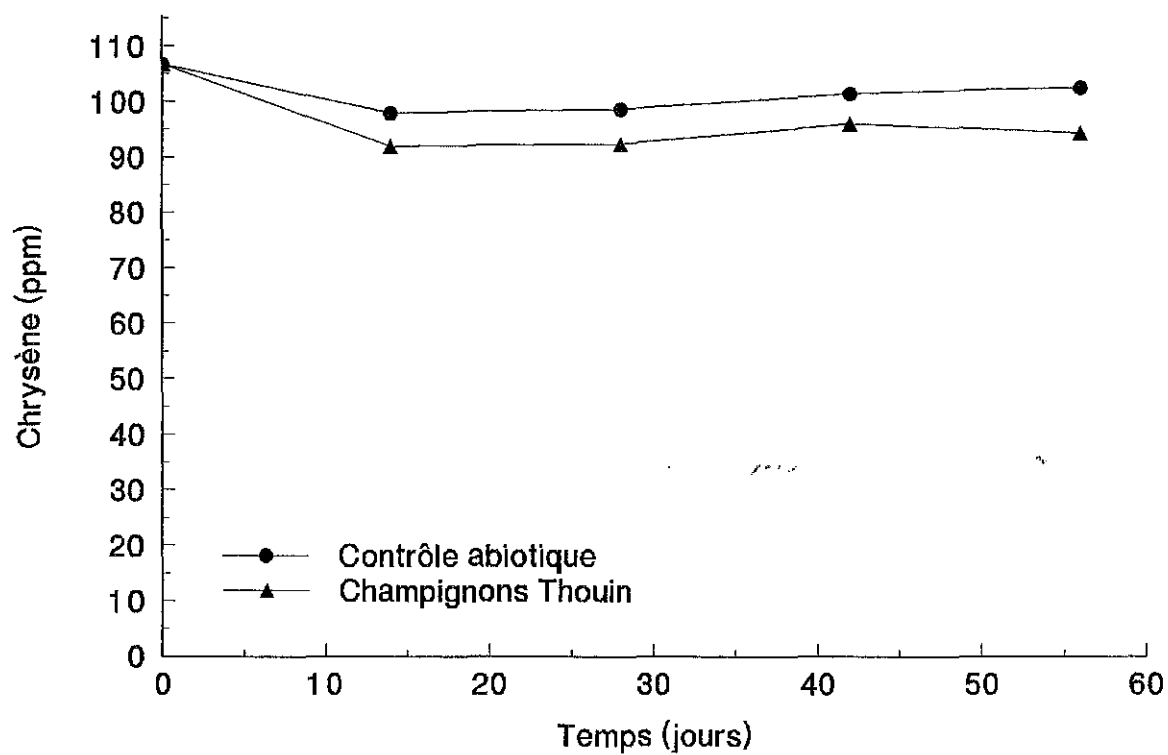


Figure 14. Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques, par les champignons indigènes de la sablière Thouin. Analyses effectuées au CLHP.

3. CONSORTIUM BACTÉRIEN CHRYSÈNE

3.1 Dilutions des cultures biphasiques

Une fois la stabilité de la culture bactérienne de maintien établie, des cultures biphasiques ont été ensemencées avec différentes dilutions de cette culture (Figure 15). Les deux cultures ayant été ensemencées avec les inoculums les moins dilués (10^{-1} et 10^{-2}) ont montré une dégradation d'environ 90 ppm de chrysène après 14 jours d'incubation. La culture contenant l'inoculum dilué 1000 fois (10^{-3}) a dégradé environ 80 ppm de chrysène au bout de 28 jours d'incubation. Toutes les autres cultures ayant reçu un inoculum plus dilué (10^{-4} à 10^{-6}) ont dégradé moins de 50 ppm de chrysène après 28 jours. Des extractions effectuées après 42 jours d'incubation des 3 cultures ayant reçu les inoculums les plus dilués n'ont pas montré une dégradation plus importante du chrysène (données non présentées). La culture ensemencée avec l'inoculum dilué 1000 fois a été maintenue par repiquages successifs.

3.2 Repiquages

Les cultures biphasiques qui ont été ensemencées avec un aliquot dilué (1/1000) de la culture de maintien décrite plus haut conservaient leur capacité à dégrader le chrysène après des repiquages dans des cultures fraîches. Ces repiquages ont été effectués tels que décrits plus haut, de façon régulière, chaque fois qu'environ 50 ppm du chrysène avaient été dégradés. Ces cultures ont conservé leur capacité de biodégradation du chrysène d'un repiquage à l'autre.

Après le cinquième repiquage, une deuxième série de dilutions similaires à la précédente a été préparée dans le but d'effectuer un enrichissement supplémentaire du consortium bactérien. La cinétique de biodégradation des cultures inoculées avec ces dilutions a été déterminée (Figure 16). Aucune variation significative n'a été observée dans les contrôles abiotiques. Après une période de latence d'environ 14 jours une biodégradation a été observée dans tous les cas. Cependant, la culture ayant été ensemencée avec un inoculum de la culture de maintien diluée à 10^{-2} n'a pas poursuivi la dégradation après 21 jours d'incubation. Les trois autres cultures (inoculum dilué de 10^{-1} , 10^{-3} et 10^{-4}) ont toutes démontré une biodégradation du chrysène égale ou supérieure à 60

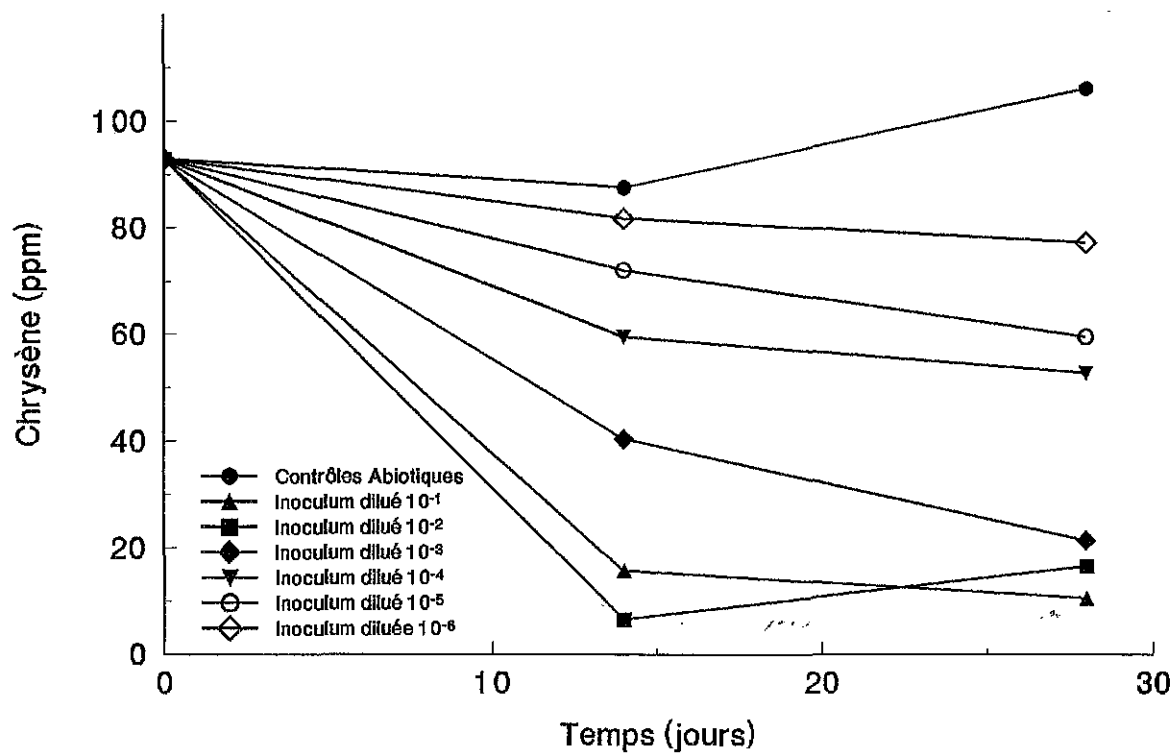


Figure 15. Biodégradation du chrysène, en cultures biphasiques inoculées avec des dilutions de la culture de maintien.

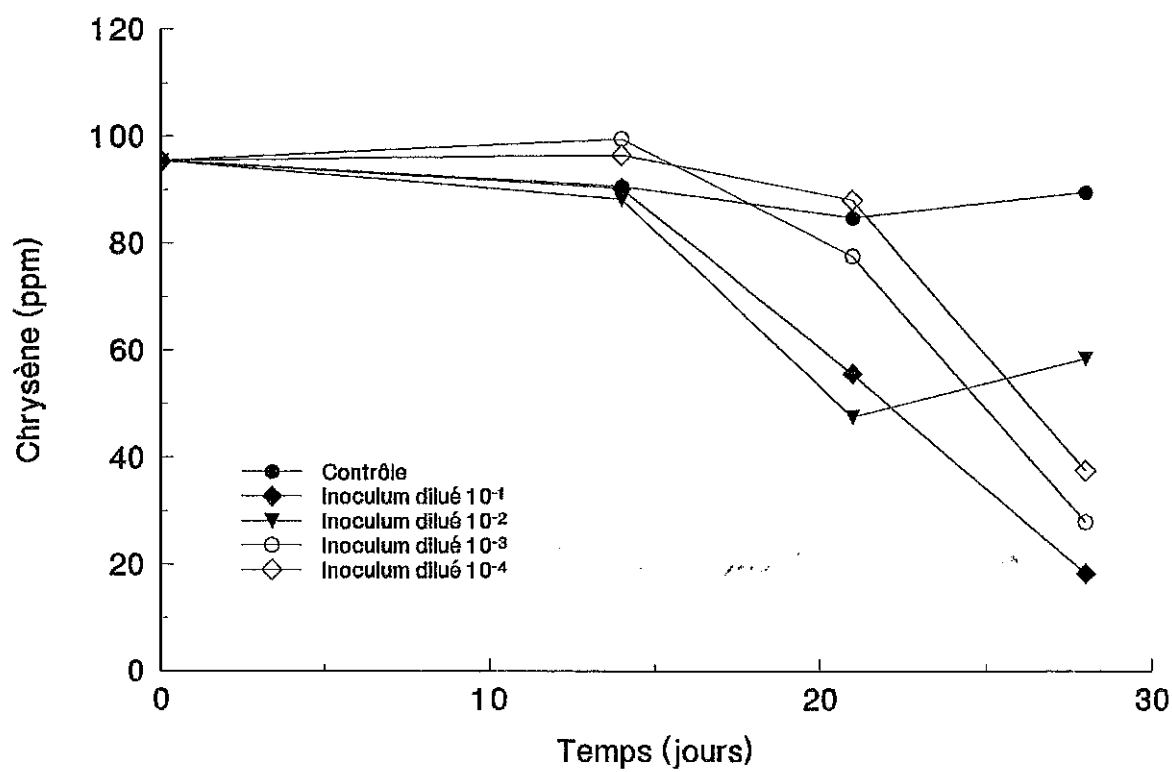


Figure 16. Biodégradation du chrysène en cultures biphasiques inoculées avec des dilutions du consortium chrysène.

ppm après 28 jours d'incubation. Ces quatre cultures ont été repiquées dans des milieux frais au 28^{ème} jour. Les 3 cultures ont conservé leur activité de biodégradation suite à ce repiquage alors que l'autre ne l'a pas récupérée. Le consortium bactérien provenant de l'inoculum dilué 10^{-4} a été repiqué de façon régulière, à toutes les deux semaines, pour en faire une seconde culture de maintien. Ce consortium a été nommé consortium chrysène.

4. CARACTÉRISATION DU CONSORTIUM CHRYSÈNE

4.1 Spectre de pH

Une série de cultures biphasiques a été effectuée afin d'étudier les taux de biodégradation du chrysène par le consortium en fonction d'une variation de pH du milieu de culture (Figure 17). À pH 7,0, le consortium chrysène a dégradé plus de 65 ppm en 14 jours pour atteindre un total de 90 ppm après 28 jours d'incubation. En milieu acide (Figure 17A), le consortium était moins performant qu'en milieu neutre. Dans les cultures ajustées à pH 6,0, aucune biodégradation significative du chrysène n'a été observée après 42 jours d'incubation. Par contre, à un pH de 6,5, une dégradation constante a été observée. Sous ces conditions, une dégradation significative (~25 ppm) a été observée dès le 14^{ème} jour d'incubation pour atteindre un total d'environ 80 ppm de chrysène après 28 jours d'incubation. Le consortium chrysène a semblé plus tolérant à des milieux alcalins (Figure 17B), bien qu'une meilleure performance ait été obtenue en milieu neutre. Dans les cultures ajustées à pH 7,5, aucune dégradation significative n'a été observée jusqu'au 14^{ème} jour, mais une dégradation d'environ 70 ppm a été observée après 28 jours d'incubation. Sous ces conditions, une biodégradation totale de 85 ppm a été obtenue après 42 jours. Dans les cultures à pH 8,0, la biodégradation a été plus lente mais plus constante, atteignant un peu plus de 40 ppm et 80 ppm au 28^{ème} et 42^{ème} jour d'incubation, respectivement.

4.2 Spectre de dégradation des HAP

Des cultures biphasiques contenant différents HAP ont été préparées afin d'étudier le spectre d'activité du consortium chrysène. Dans un premier temps des cultures contenant des HAP déjà utilisés au cours de ces travaux (phénanthrène, pyrène), ainsi que des contrôles positifs contenant du chrysène ont été préparés (Figure 18). Dans les

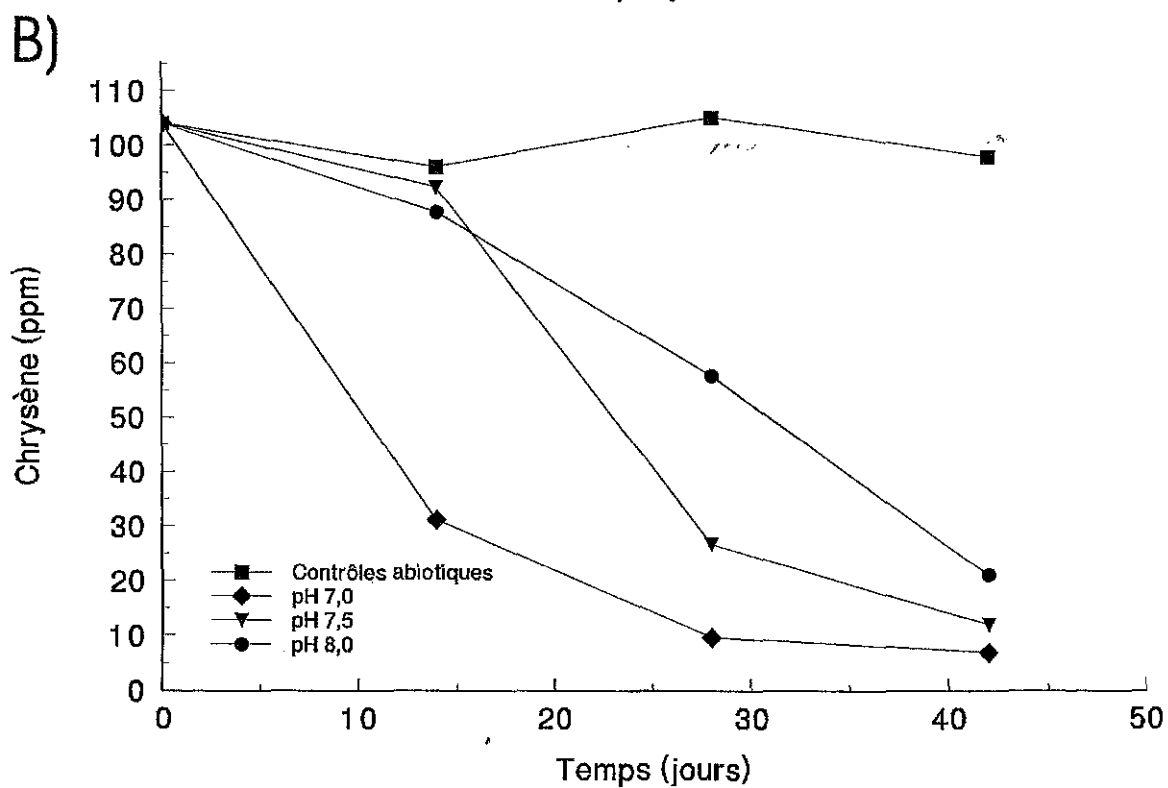
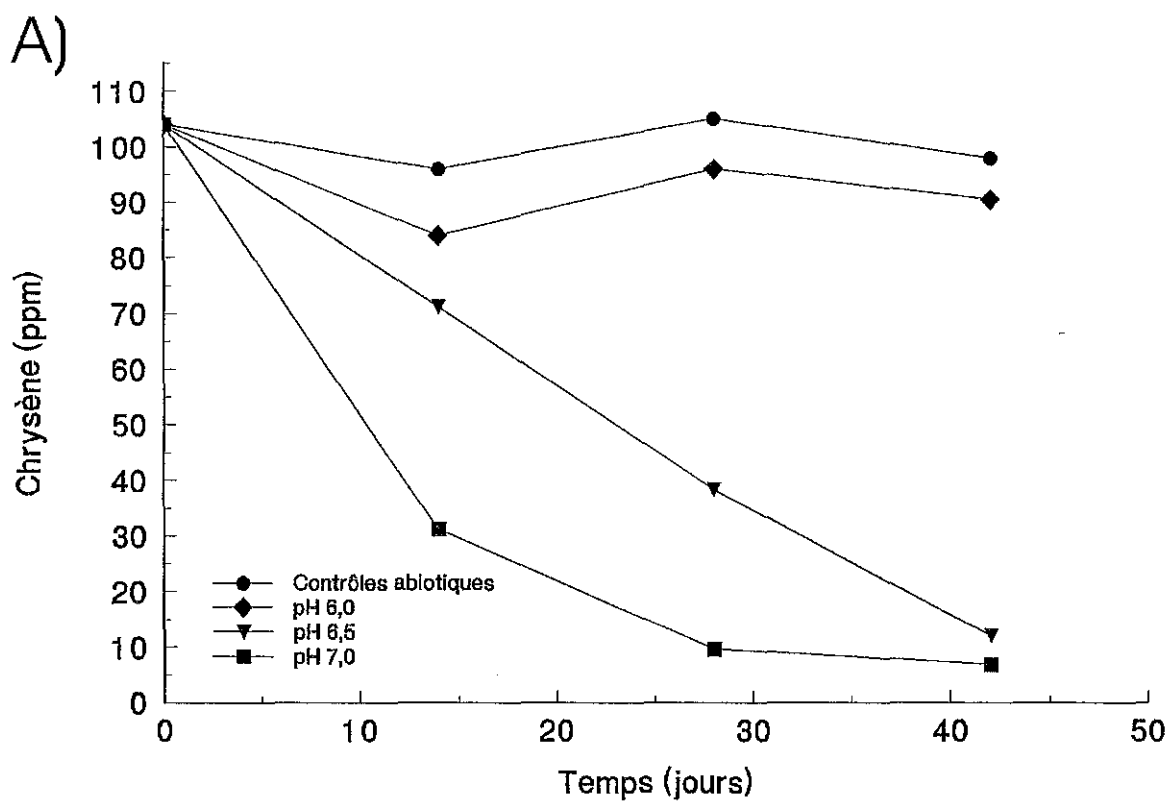
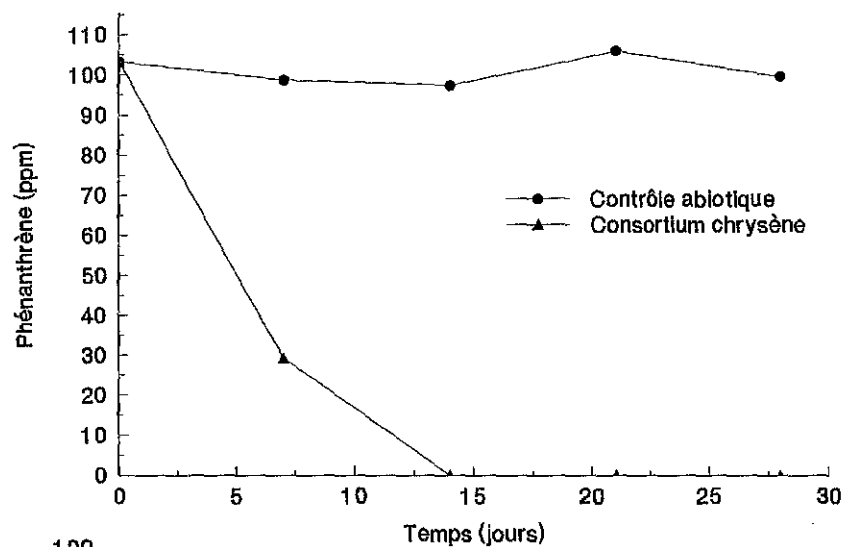
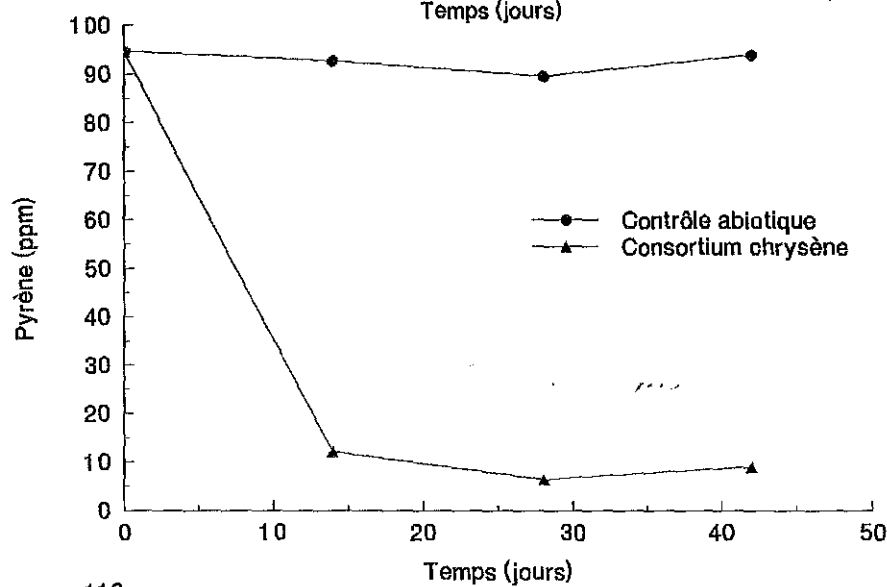


Figure 17. Biodégradation du chrysène par le consortium dans des cultures biphasiques ajustées à différents pH. A) pH de 6.0 à 7.0
B) pH de 7.0 à 8.0

A)



B)



C)

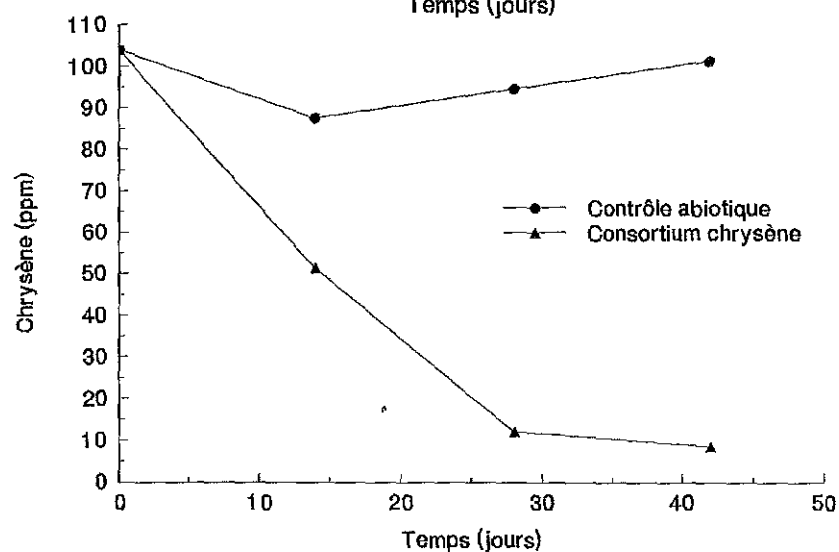


Figure 18. Cinétiques de biodégradation de HAP par le consortium chrysène en culture biphasique. A) Phénanthrène B) Pyrène C) Chrysène

cultures contenant du phénanthrène (Figure 18A) le consortium a très rapidement dégradé ce HAP. Dès le 7^{ème} jour d'incubation, plus de 70 ppm de phénanthrène avaient été dégradés. À partir du 14^{ème} jour de culture, la dégradation était complète car aucune trace de phénanthrène n'a été détectée dans les cultures à partir de ce temps d'incubation. Dans les cultures contenant le pyrène (Figure 18B), la dégradation a aussi été très rapide. Après 14 jours d'incubation, plus de 85 ppm de pyrène avaient été dégradés par le consortium chrysène. Aucune dégradation supplémentaire n'a été enregistrée par après, laissant une quantité résiduelle d'environ 15 ppm dans les cultures. En présence de chrysène (Figure 18C), le consortium s'est comporté de façon habituelle, montrant une dégradation d'environ 85 ppm de chrysène après 28 jours d'incubation, laissant aussi une quantité résiduelle d'environ 15 ppm.

Dans un deuxième temps, des cultures biphasiques contenant des HAP plus lourds que le chrysène (benzo(a)pyrène et pérylène) ont été préparées afin de vérifier la capacité du consortium à les dégrader (Figure 19). Dans les cultures contenant le benzo(a)pyrène, aucune dégradation significative n'a pu être observée, au cours des 28 premiers jours d'incubation. Au 42^{ème} jour une différence de 20 ppm entre le contrôle abiotique et la culture a été observée, mais celle-ci n'a pas été jugée significative. De façon similaire, les cultures contenant le pérylène comme unique source de carbone (Figure 19B) n'ont pas démontré de biodégradation significative après 42 jours d'incubation.

4.3 Minéralisation du chrysène

Dans le but de déterminer si la biodégradation du chrysène était complète dans les cultures biphasiques inoculées avec le consortium chrysène, des cultures de minéralisation ont été effectuées. Des duplicata ont été effectués et ces derniers ont été nommés cultures 1 et 2. Les pourcentages de minéralisation ont été déterminés en considérant un total de 110 000 dpm comme représentant une minéralisation à 100% et en divisant les comptes obtenus par ce total.

Une minéralisation significative a été observée dans une seule des deux cultures, soit la culture 1 (Figure 20). Dès le 5^{ème} jour, une différence d'environ 1000 dpm entre

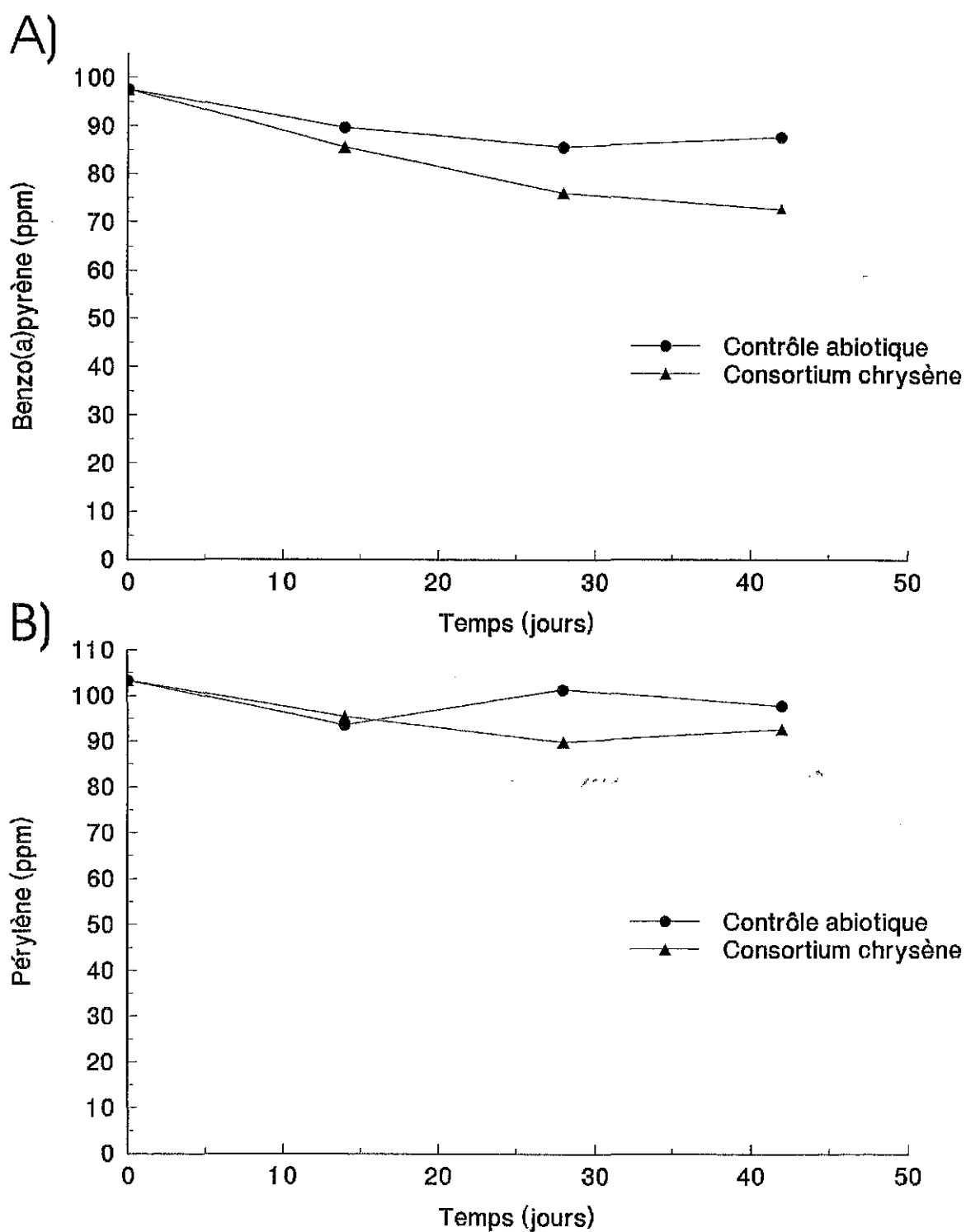


Figure 19. Cinétiques de biodégradation de HAP en culture biphasique par le consortium chrysène. A) Benzo(a)pyrène B) Pérylène

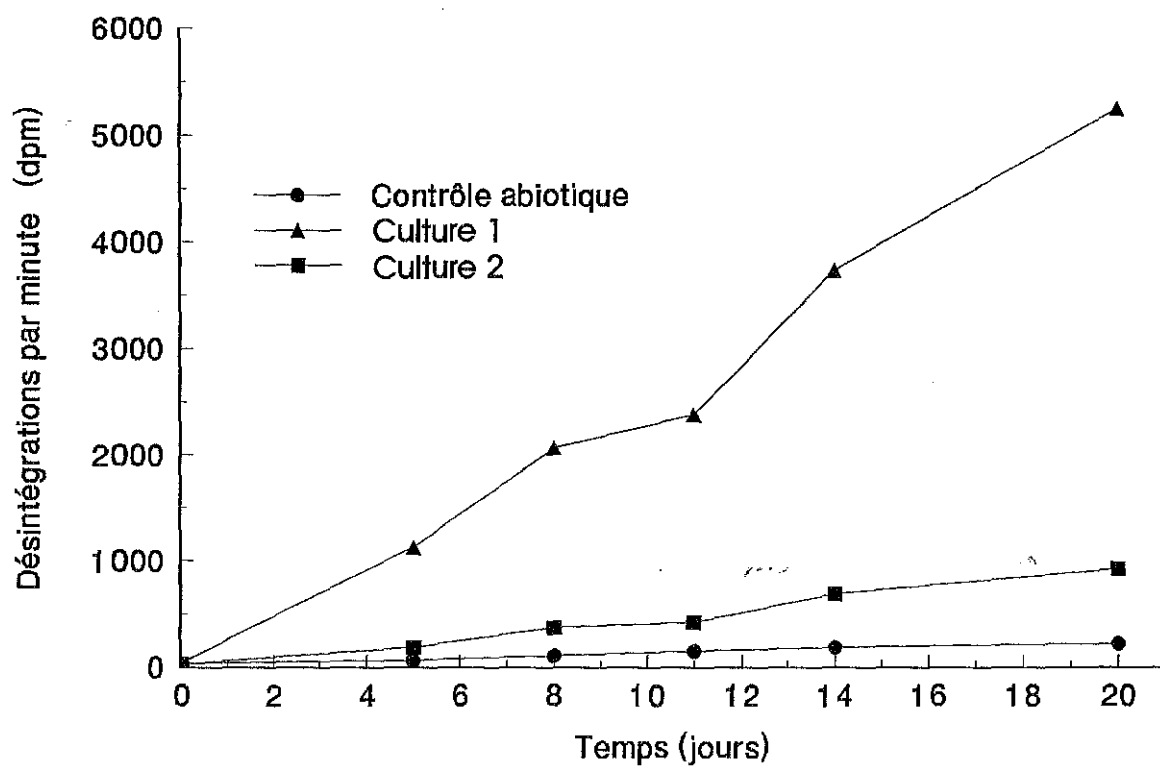


Figure 20. Minéralisation progressive du [5,6,11,12- ^{14}C]-chrysène, en culture biphasique, par le consortium chrysène.

cette culture et le contrôle abiotique a été observée. Au bout de 20 jours d'incubation, un total de 5240 dpm a été enregistré dans cette culture, soit une minéralisation totale d'environ 5%. L'autre culture (culture 2) n'a pas montré une différence significative avec le contrôle abiotique, soit une différence d'au moins 5 fois avec ce dernier. Aucune des deux cultures n'est devenue trouble, suggérant que la croissance des bactéries du consortium était plutôt faible. Il est possible que ces cultures aient été inhibées par le KOH lors des manipulation car une évaluation du pH des contrôles non radioactifs a montré un pH supérieur à 9,0 dans une des fioles. Ceci pourrait expliquer l'inhibition de la croissance.

Une deuxième série de cultures de minéralisations a été préparée et inoculée avec la culture de maintien du consortium. La récolte du KOH a été faite minutieusement pour éviter le déversement dans le milieu de culture. Une seule des deux cultures a montré une minéralisation significative et celle-ci a été beaucoup plus forte que précédemment (Figure 21). Au 2^{ème} jour d'incubation, un compte de 1093 dpm a été observé pour cette culture. Ce compte est passé à 28863 dès le 4^{ème} jour, totalisant 26% de minéralisation. Au 6^{ème} jour, plus de 44% du [5,6,11,12-¹⁴C]-chrysène ajouté avait été minéralisé dans cette culture. Le taux de minéralisation a ensuite fortement diminué et au bout de 12 jours, le compte total atteignait 51284 dpm, soit une minéralisation totale d'environ 47%. De plus, cette culture a développé une forte turbidité au niveau de la phase liquide, indiquant une croissance bactérienne importante. Ce phénomène ne s'était pas manifesté dans la première série de cultures de minéralisation. L'autre culture n'a montré aucune turbidité dans la phase liquide, ni de minéralisation significative.

Pour confirmer les résultats de l'expérience précédente et tenter d'obtenir des résultats positifs dans les deux cultures, l'expérience a été répétée une troisième fois (Figure 22). Cette fois-ci, des résultats positifs ont été observés dans les deux cultures, soit une minéralisation significative et l'apparition d'une turbidité importante. Dans la culture 1, une période de latence de 8 jours a été observée avant qu'une minéralisation rapide survienne. Entre le 8^{ème} et le 10^{ème} jour, le compte de désintégration est passé de 856 à 5525 dpm, soit de 0,8 % à 5% de minéralisation. Le taux de minéralisation s'est

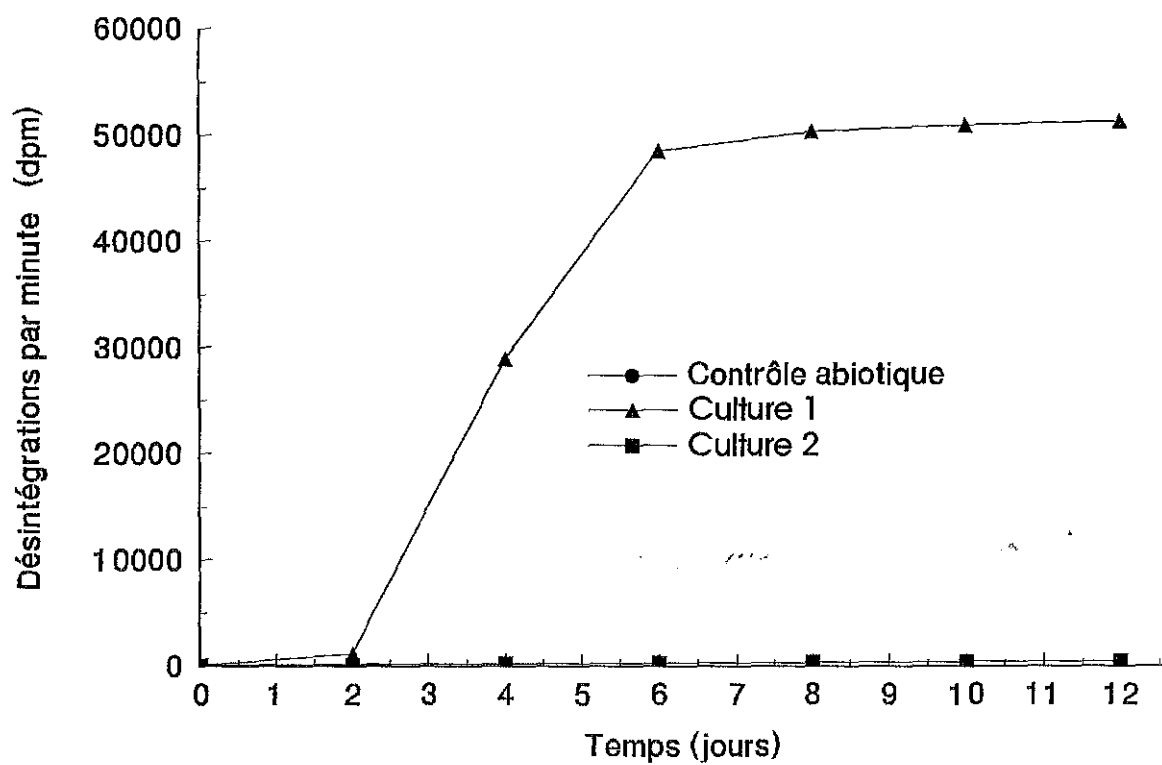


Figure 21. Minéralisation progressive du [5,6,11,12- ^{14}C]-chrysène, en culture biphasique, par le consortium chrysène.

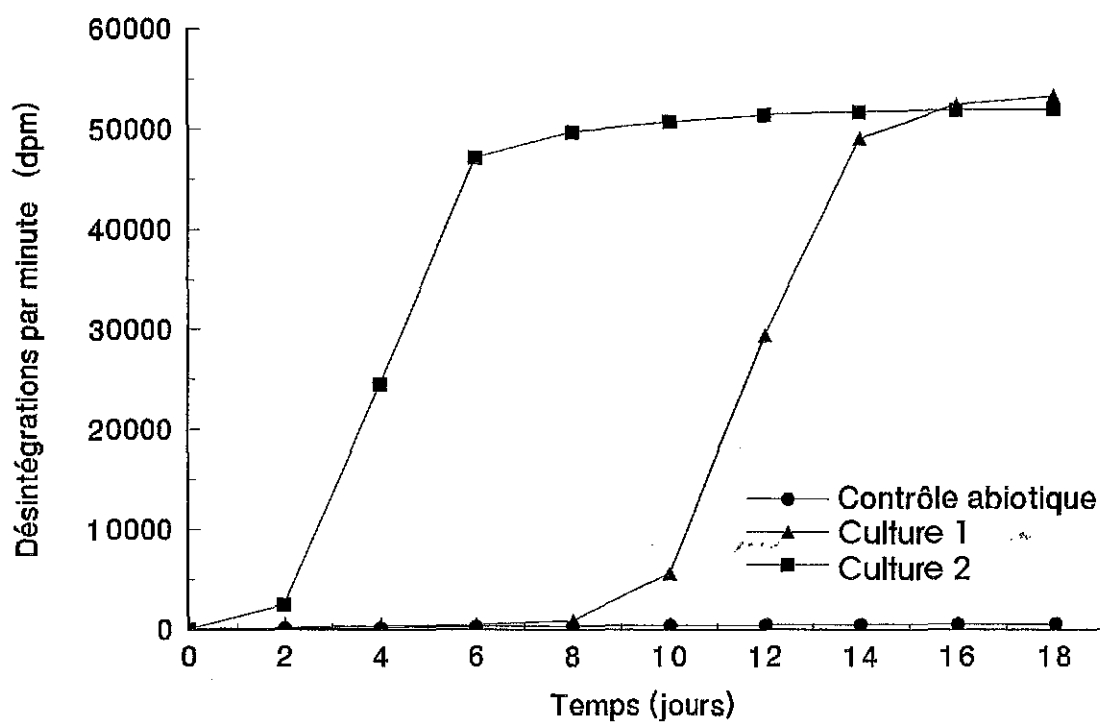


Figure 22. Minéralisation progressive du [5,6,11,12- ^{14}C]-chrysène, en culture biphasique, par le consortium chrysène.

ensuite accéléré encore plus pour atteindre un compte total de 48975 dpm après 14 jours, soit environ 45% de minéralisation. Par la suite, le taux de minéralisation a fortement diminué pour atteindre une minéralisation totale de 48% après 18 jours d'incubation. La culture 2 a montré une minéralisation significative dès le 2^{ème} jour en présentant un compte de 2443 dpm, soit une minéralisation de 2%. La minéralisation s'est ensuite accélérée pour atteindre un compte total de 47073 dpm au 6^{ème}, soit une minéralisation cumulative de 43%. Puis, la vitesse de minéralisation a ensuite diminué rapidement et environ 47% du [5,6,11,12-¹⁴C]-chrysène ajouté a été minéralisé au bout de 18 jours d'incubation.

4.4 Études des souches du consortium chrysène

4.4.1 Dénombrement des souches isolées du consortium chrysène

Après plusieurs repiquages de la culture de maintien du consortium chrysène, un dénombrement des colonies macroscopiquement différentes a été effectué. Dans un premier temps, des étalements sur géloses Tryptic Soy Broth (TSB) ont été effectués pour observer et répertorier les différentes colonies (Tableau 9). Six souches différentes ont été observées et nommées S1 à S6. Les souches S1, S2 et S3 avaient des vitesses de croissance plus élevées, apparaissant sur les géloses en moins de 24 heures d'incubation à température de la pièce. Les 3 autres souches apparaissaient au bout de 48 à 72 heures d'incubation. D'autres étalements sur des milieux TSB ont été effectués afin de dénombrer chacune des souches observées dans le consortium chrysène (Tableau 10). Des aliquots de trois différentes cultures de maintien ont été prélevés au 14^{ème} jour d'incubation et les colonies ont été comptées. Les souches S1, S2 et S3 ont été celles retrouvées en plus grand nombre dans le consortium. Une moyenne de $2,9 \times 10^9$ unités formatrices de colonies par mL de milieu de culture (UFC/mL) a été calculée pour la souche S1 dans les trois cultures, $1,3 \times 10^8$ UFC/mL, pour la souche S2 et 3×10^8 UFC/mL pour la souche S3. Les trois autres souches ont été retrouvées en moins grand nombre. Une moyenne de $1,3 \times 10^7$ UFC/mL a été calculée pour la souche S4 dans les trois cultures. Les souches S5 et S6 ne sont pas apparues dans tous les dénombrements, parce que la limite minimale d'unités formatrices de colonies dénombrables avec cette technique, sous nos conditions, se chiffrait à 1×10^7 /mL. Les souches S5 et S6 étaient

Tableau 9 : Caractéristiques macroscopiques des souches isolées du consortium chrysène

Souches	Description des colonies	Grosueur moyenne des colonies (après 48 heures d'incubation)
S1	Beige pâle mat et bombée	5-10 mm
S2	Blanche luisante et bombée	~1 mm
S3	Beige-verte luisante et plate	1-3 mm
S4	Jaunâtre trouble luisante et légèrement bombée	< 1 mm
S5	Beige translucide mat et plate, très petite	<< 1mm
S6	Orange luisante et bombée	1-3 mm

Tableau 10 : Dénombrement des souches bactériennes composant le consortium chrysène dans 3 cultures de maintien différentes, après 14 jours d'incubation

Souches	Unités formatrices de colonies/mL		
	Culture 1	Culture 2	Culture 3
S1	$3,41 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,89 \times 10^9$
S2	$1,1 \times 10^8$	8×10^7	$2,1 \times 10^8$
S3	$2,6 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$
S4	2×10^7	3×10^7	1×10^7
S5	$< 10^7$	1×10^7	3×10^7
S6	1×10^7	2×10^7	$< 10^7$

relativement peu nombreuses par rapport aux 3 souches principales. Malgré cela, les moyennes ont été évaluées comme étant de $1,3 \times 10^7$ UFC/mL pour la souche S5 dans deux de cultures et 1×10^7 UFC/ml pour la souche S6 dans deux des cultures.

4.4.2 Coloration et observation microscopique des souches du consortium.

Les observations microscopiques effectuées ont révélé que les 6 souches étaient toutes des bâtonnets plus ou moins courts (Tableau 11). La souche S6 a été la seule qui présentait une forme différente des autres, étant un bâtonnet sphéroïde de très petite taille comparativement aux autres. Seules les souches S4 et S6 ont été classées comme Gram positives, les 4 autres ont démontré une coloration Gram négative. La souche S2 se colorait mal et était difficile à discerner au microscope optique car elle était très pâle. La souche S5 se colorait de façon non uniforme, lui donnant une allure mal définie.

4.5 Étude de la biodégradation du chrysène par des souches isolées du consortium.

Étant donné que le consortium était composé de 3 souches majoritaires (S1, S2 et S3), des cultures biphasiquesensemencées avec chacune de ses souches ont été préparées (Figure 23). De plus, des contrôles négatifs (abiotiques) et positifs (consortium entier) ont aussi été préparés. Aucune perte n'a été observée dans les contrôles abiotiques. Cependant, une dégradation constante a été observée dans le contrôle positif (consortium chrysène entier) pendant les 21 premiers jours d'incubation. Une dégradation totale d'environ 90 ppm de chrysène a été obtenue après cette période. Par la suite, la dégradation a été beaucoup plus lente. La culture inoculée avec le mélange des 3 souches tout comme celles inoculées avec les souches pures n'ont montré aucune dégradation significative du chrysène après 28 jours d'incubation.

4.6 Vaporisation de HAP sur des milieux inoculés avec des souches du consortium.

Afin de déterminer si certaines des six souches isolées du consortium chrysène pouvaient oxyder certains HAP, du phénanthrène, pyrène et chrysène ont été vaporisés sur différentes géloses BHY 0,05% (p/v) inoculées avec ces souches. Seules les colonies des souches S4 et S5 ont formé des halos d'éclaircissement autour d'elles. Après 48 jours d'incubation, la souche S4 a formé des halos sur les géloses contenant du phénanthrène.

Tableau 11 : Coloration Gram et observations microscopiques des souches isolées du consortium chrysène

Souches	Coloration Gram	Description
S1	Nég.	Bâtonnet
S2	Nég.	Bâtonnet, très pâle
S3	Nég.	Court bâtonnet
S4	Pos.	Bâtonnet
S5	Nég.	Court bâtonnet, mal défini
S6	Pos.	Très court bâtonnet, presque sphérique

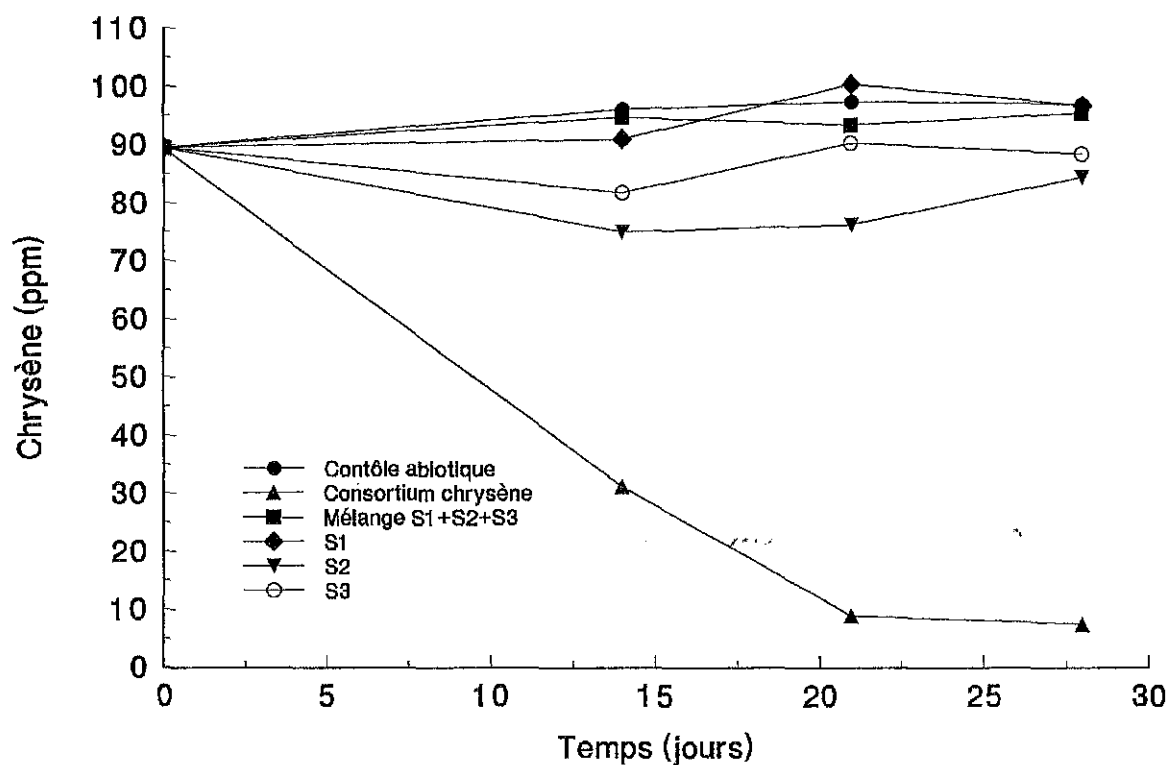


Figure 23. Biodégradation du chrysène, en culture biphasique, par des souches bactériennes isolées des cultures de maintien du consortium chrysène. Comparaison entre le consortium entier, un mélange des trois souches majoritaires et chacune de ces trois souches en cultures pures.

Elle n'a pas fait de halos dans le cas du pyrène et du chrysène. La souche S5 a formé des halos autour des colonies sur les géloses contenant du phénanthrène et du pyrène après 24 et 48 heures d'incubation, respectivement. C'est donc dire qu'aucune souche n'a produit de halos sur les géloses vaporisées avec le chrysène et ce, après plus de 14 jours d'incubation.

5. SOUCHES BACTÉRIENNES DE COLLECTION

5.1 Étude de la biodégradation du chrysène en cultures biphasiques

5.1.1 Sans acclimatation aux HAP

Afin d'étudier si des souches pures de collection, isolées lors de travaux précédents, pouvaient dégrader le chrysène, des cultures biphasiques de *Sphingomonas* S107 et *P. aeruginosa* 57, toutes deux reconnues pour dégrader certains HAP, ont été préparées à partir d'une suspension de cellules provenant de stocks congelés (Figure 24). Après 42 jours d'incubation, aucune des 2 souches n'a démontré une biodégradation significative du chrysène.

Afin de confirmer l'absence d'activité de biodégradation par les souches de *Sphingomonas* 107 et *P. aeruginosa* 57, de nouvelles cultures biphasiques ont été préparées. Elles ont étéensemencées à partir de suspensions de cellules bactériennes des mêmes souches mais provenant de stocks congelés différents de ceux utilisés précédemment. Une fois de plus, aucune des deux souches n'a montré une biodégradation significative du chrysène après 42 jours d'incubation (données non présentées). Des cultures de *Sphingomonas* 107 et *P. aeruginosa* 57 capables de dégrader le chrysène n'ont pu être obtenues.

5.1.2 Avec acclimatation aux HAP

Des cultures biphasiques ont été inoculées avec des suspensions des souches 107 ou 57 ayant été préalablement incubées en présence de phénanthrène. Ceci a été entrepris afin d'observer si une acclimatation aux HAP activerait les mécanismes de biodégradation chez ces souches pures, leur permettant de dégrader le chrysène.

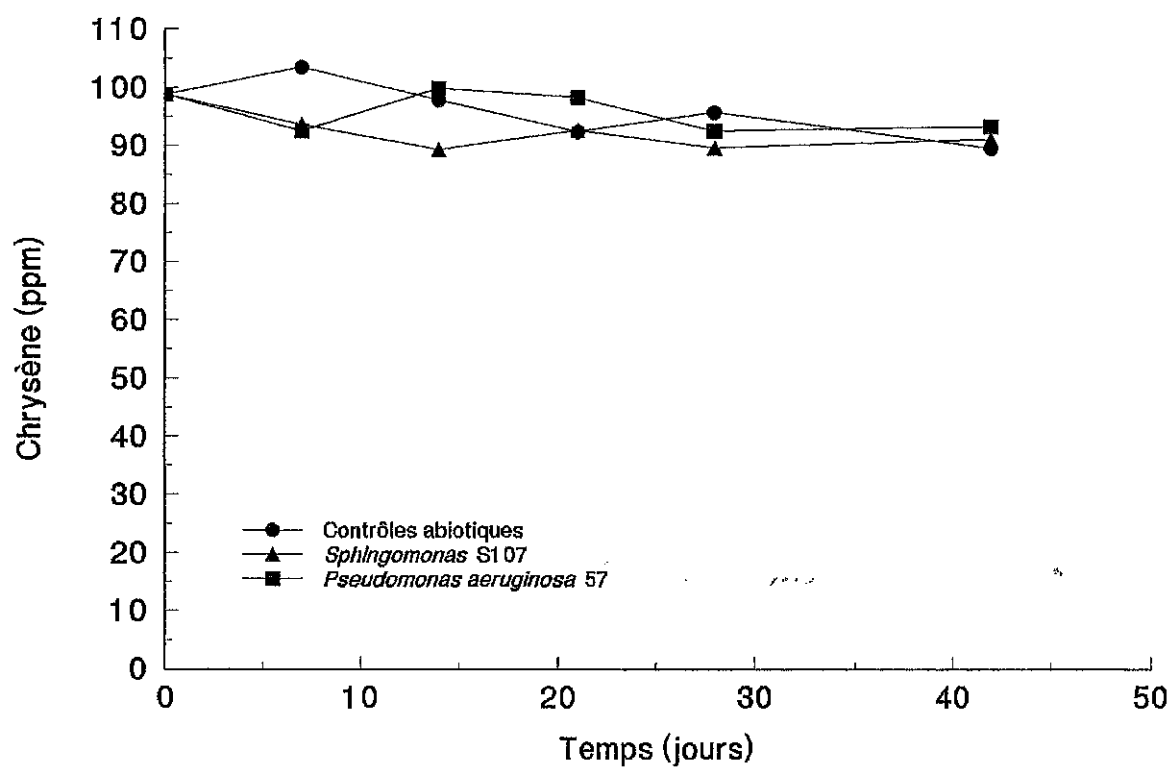


Figure 24. Biodégradation du chrysène par des souches bactériennes pures de collection.

Dans un premier temps, des cultures biphasiques ensemencées avec chacune des deux souches (107 et 57) et contenant du phénanthrène comme unique source de carbone ont été préparées afin d'étudier si ces souches, apparemment incapable de dégrader le chrysène, ont conservé leur capacité de dégrader le phénanthrène (Figure 25). Les deux souches ont été en mesure de dégrader rapidement le phénanthrène, confirmant qu'elles avaient conservé les mécanismes de biodégradation de certains HAP. Dès le 14^{ème} jour, les deux souches avaient presque complètement dégradé le phénanthrène présent dans les cultures, environ 100 ppm dans chacun des cas.

Suite à l'expérience décrite précédemment, des cultures biphasiques contenant du chrysène ont été ensemencées avec des suspensions provenant des cultures effectuées en présence de phénanthrène. Aux cultures biphasiques habituelles, contenant un milieu liquide minimal BH, ont été jumelées des cultures biphasiques dont le milieu BH a été enrichi d'extrait de levures en raison de 0,5% (p/v) (BHY 0,5%). Ces cultures ont été préparées afin d'évaluer la possibilité qu'un milieu plus riche puisse favoriser la biodégradation du chrysène par les souches pures (Figure 26). Dans les cultures contenant le milieu BH, aucune dégradation significative n'a été observée (Figure 26A). Malgré une diminution apparente de la concentration du chrysène dans la culture inoculée avec la souche 57 de *Pseudomonas* au 14^{ème} jour d'incubation, la différence entre la concentration de chrysène extraite dans le contrôle abiotique et cette culture a été en deçà de 20 ppm et donc jugée non significative. Une extraction effectuée 14 jours plus tard est venue confirmer l'absence de biodégradation du chrysène par les deux souches. De façon similaire, aucune dégradation n'a été observée dans les cultures contenant le milieu BHY 0,5% (Figure 26B). Au 28^{ème} jour d'incubation, une différence d'un peu plus de 20 ppm a été observée entre le contrôle abiotique et la culture inoculée par la souche 107 de *Sphingomonas*, mais une extraction supplémentaire au 42^{ème} jour a montré qu'aucune biodégradation significative de chrysène n'a été effectuée par la souche 107.

5.1.3 Spectre de dégradation

Deux souches différentes de *Sphingomonas*, la souche 107 et une autre identifiée comme la souche 105 ont été choisies afin de déterminer leur spectre de dégradation

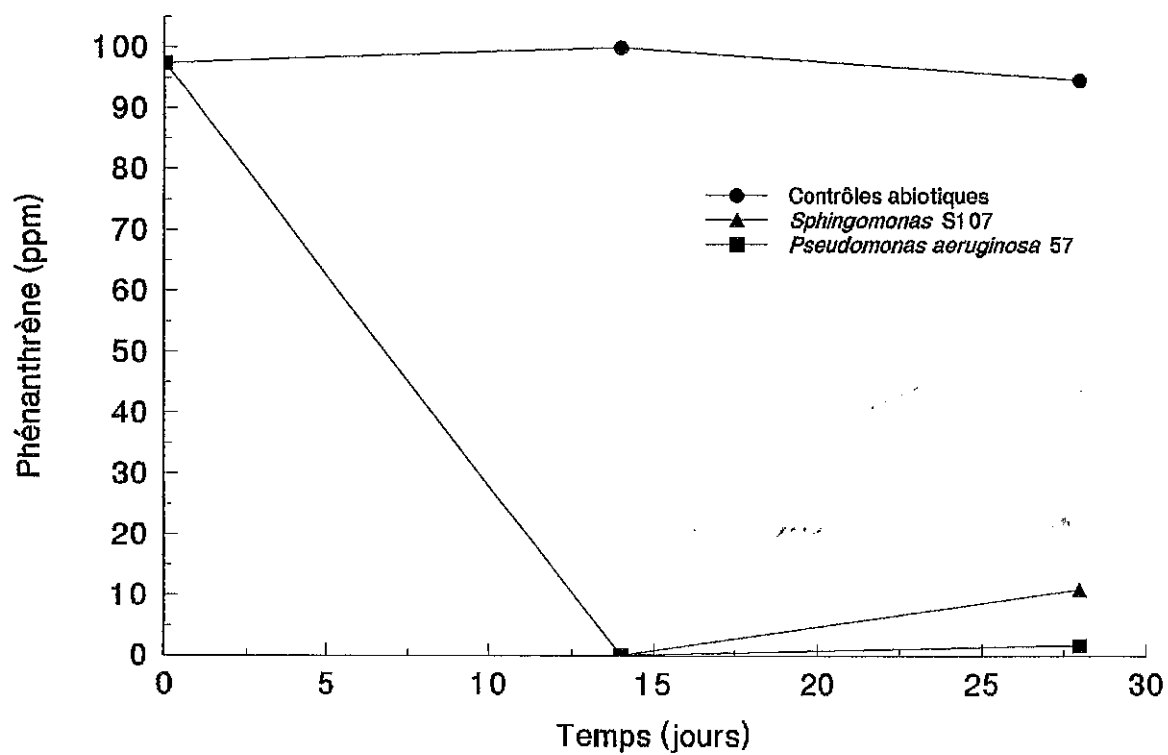


Figure 25. Biodégradation du phénanthrène par des souches bactériennes pures de collection

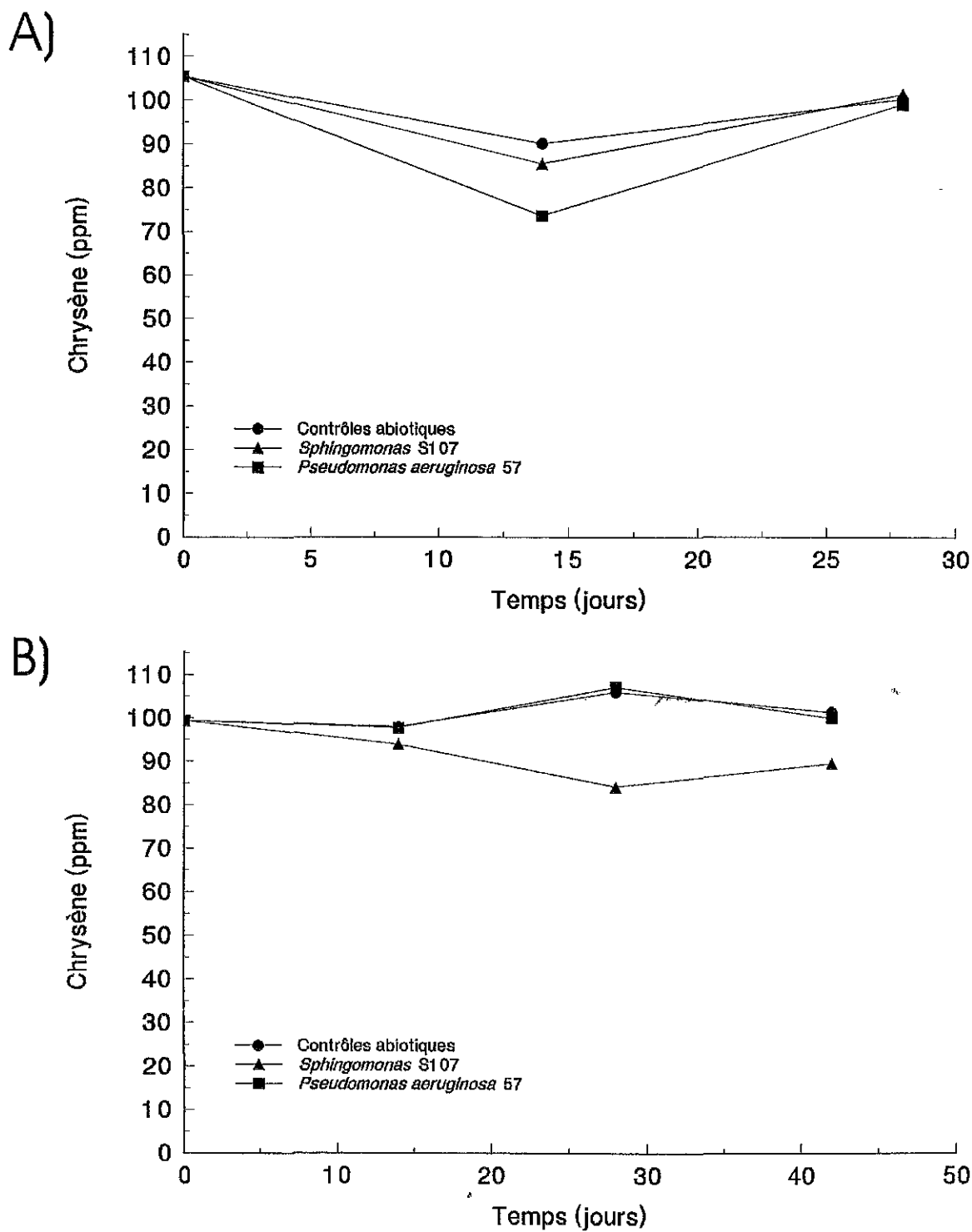


Figure 26. Biodégradation du chrysène par des souches bactériennes pures acclimatées au phénathrène. A) Milieu liquide BH B) Milieu liquide BHY 0,5% (p/v)

envers des HAP à 3 cycles et plus. La souche 107 a été utilisée parce qu'elle est performante dans la dégradation du phénanthrène et du pyrène. La souche 105 a été choisie car elle aussi était une autre souche capable d'utiliser le pyrène comme unique source de carbone. Ces souches ont d'abord été cultivées en présence de phénanthrène pendant 7 jours avant d'être inoculées dans les différentes cultures biphasiques contenant chacune un des autres HAP.

La Figure 27 montre les résultats observés dans les cultures biphasiques contenant des HAP de 3 ou 4 cycles aromatiques, soit le phénanthrène, le pyrène et le chrysène. Les deux souches de *Sphingomonas* ont presque complètement dégradé les 100 ppm de phénanthrène présents après 7 jours d'incubation (Figure 27A). Les résultats obtenus au 14^{ème} et 21^{ème} jour ont confirmé cette biodégradation. Les deux souches ont aussi dégradé le pyrène contenu dans les cultures biphasiques (Figure 27B). La souche 105 a été la plus rapide avec une dégradation de plus de 60 ppm de pyrène après 14 jours comparativement à 30 ppm pour la souche 107. Après 42 jours d'incubation la biodégradation a été presque complète pour les deux souches. Dans les cultures contenant le chrysène (Figure 28C), aucune biodégradation significative n'a été observée après 42 jours d'incubation.

La Figure 28 montre les résultats observés dans les cultures biphasiques contenant un HAP à 5 cycles aromatiques, soit le benzo(a)pyrène et le pérylène. Aucune des culturesensemencées avec l'une ou l'autre des deux souches de *Sphingomonas* n'a montré de biodégradation significative du benzo(a)pyrène (Figure 28A) ou de pérylène (Figure 28B) au cours des 42 jours d'incubation.

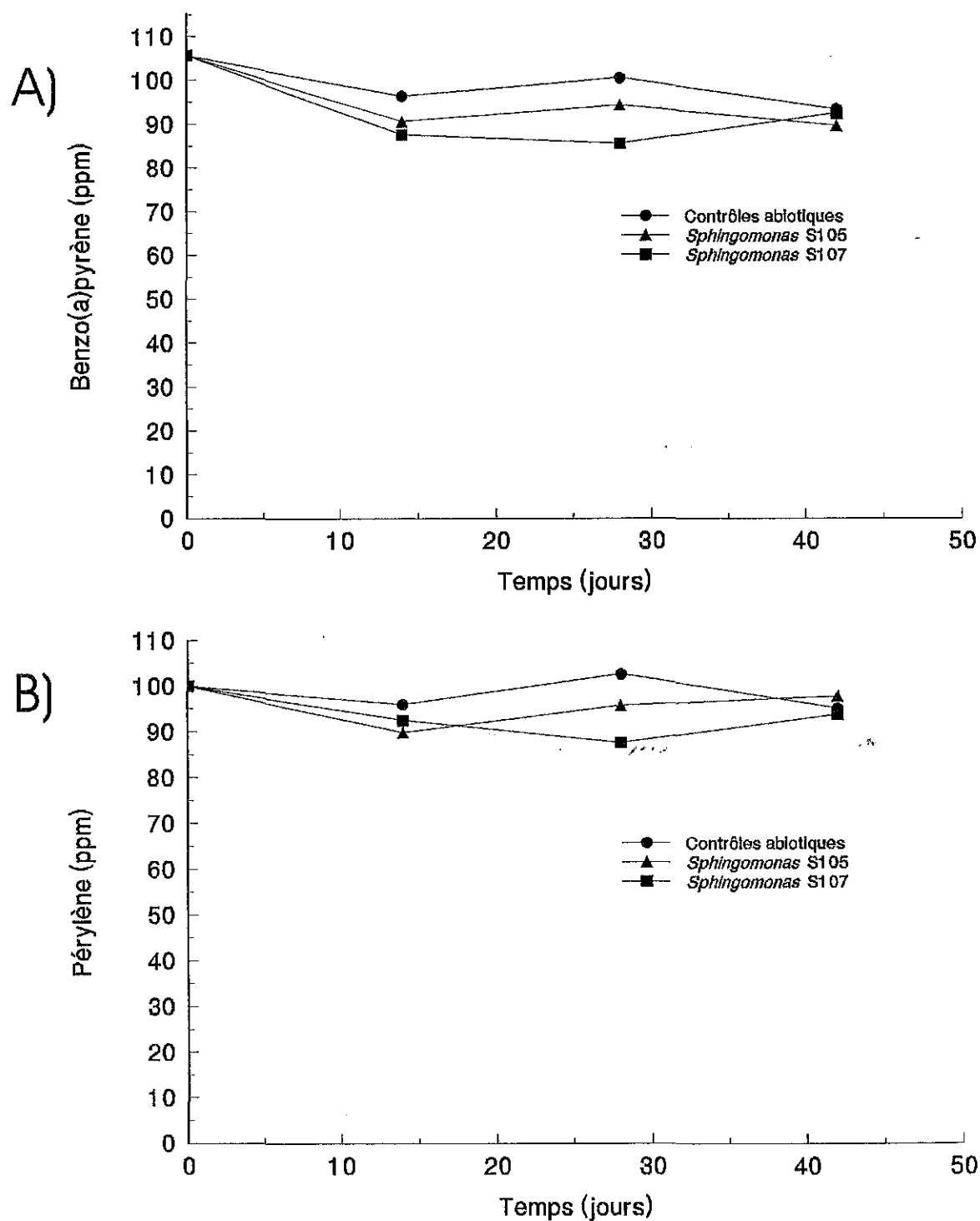
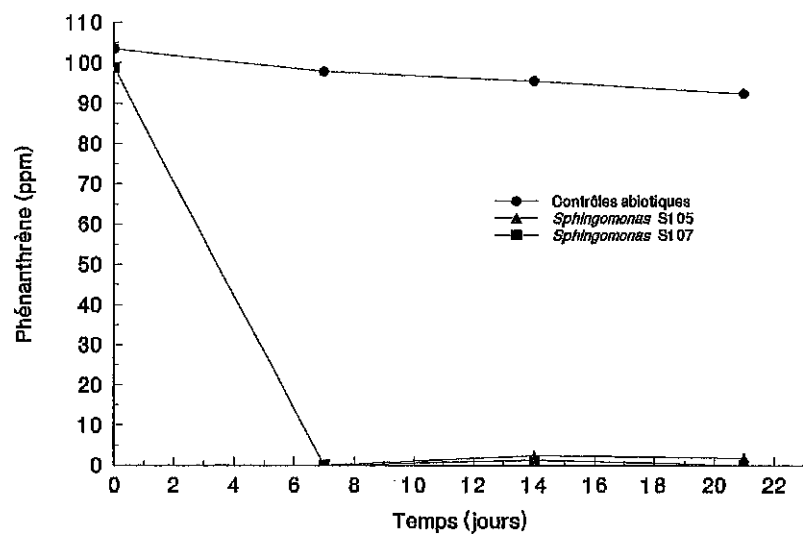
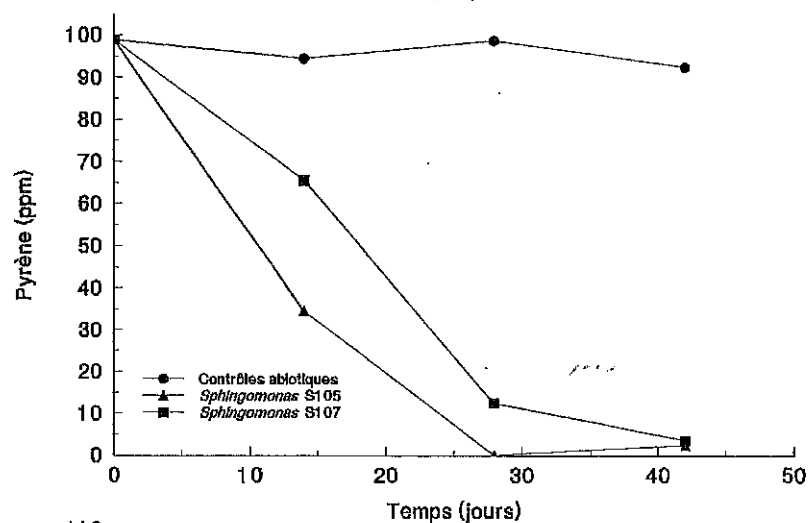


Figure 28. Spectre de biodégradation des HAP de 5 cycles aromatiques par les souches 105 et 107 à partir de suspensions bactériennes acclimatées au phénanthrène. A) Benzo(a)pyrène B) Pérylène

A)



B)



C)

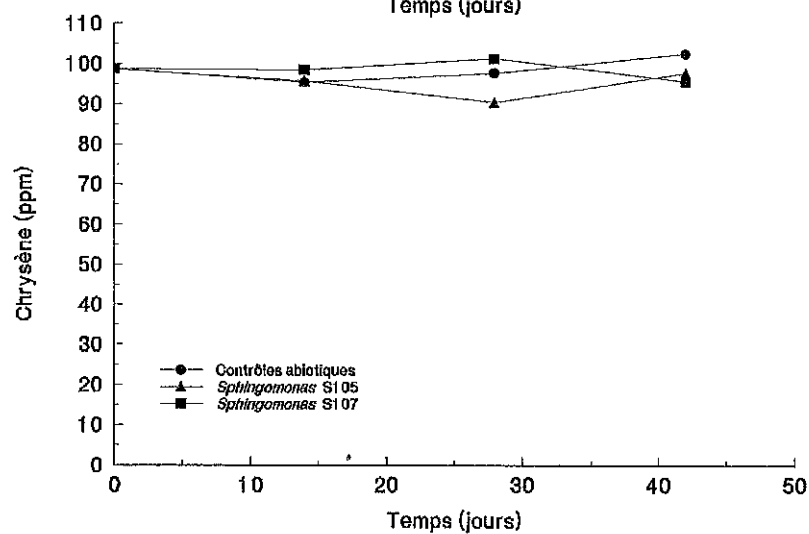


Figure 27.

Spectre de biodégradation des HAP de 3 et 4 cycles aromatiques par les souches 105 et 107 à partir de suspensions bactériennes acclimatées au phénanthrène. A) Phénanthrène B) Pyrène C) Chrysène

Discussion

1. BIODÉGRADATION DE HAP PAR UNE POPULATION BACTÉRIENNE MIXTE

1.1 Microcosmes

Les travaux précédents, effectués à partir du sol contaminé de la sablière Thouin ont démontré que la population bactérienne indigène pouvait dégrader significativement le fluorène, le phénanthrène, le pyrène et le chrysène après 60 jours d'incubation en microcosmes (Lirette, 1996). Certains paramètres de ces cultures avaient été ajustés afin d'optimiser la biodégradation de ces HAP. Par contre, une biodégradation importante du chrysène n'a pas été observée dans ces cultures.

Ces expériences ont été reprises, dans les mêmes conditions, lors de la présente étude afin de confirmer la dégradation des quatre HAP par la flore bactérienne de la sablière contaminée. Une biodégradation importante du pyrène et du chrysène a été obtenue en prolongeant les temps d'incubation des microcosmes car, après 150 jours d'incubation, la presque totalité de ces deux HAP à quatre cycles aromatiques était dégradée. Ceci a confirmé leur oxydation par la population bactérienne de la sablière Thouin, et semble impliquer qu'une biodégradation importante des HAP plus lourds tels le chrysène et le pyrène dépendrait, dans ce type de culture, de la durée de la période d'incubation. Comme l'indiquait Cerniglia (1995), les taux de dégradation des HAP ont été inversement proportionnels à la taille des molécules. Étant donné que la solubilité de ces composés diminue avec l'augmentation du nombre de cycles aromatiques, les quatre HAP ont été dégradés à des taux liés à leur solubilité respective ; c'est-à-dire que le fluorène et le phénanthrène ont été dégradés en premier parce qu'ils sont plus solubles, donc plus disponibles, que le pyrène et le chrysène.

Le repiquage de ces microcosmes dans de nouvelles cultures dans le but d'accélérer la biodégradation des HAP n'a pas montré les résultats escomptés. Il faut noter que deux paramètres ont été changés dans ces nouveaux microcosmes, soit l'apport d'un inoculum provenant des cultures précédentes et le retrait du fluorène dans le groupe des HAP ajoutés aux nouvelles cultures. De ces deux changements, l'absence du fluorène semble être le plus influent car une accélération de la biodégradation du pyrène et du chrysène a

été observée dans les cultures inoculées ainsi que dans les cultures non inoculées servant de contrôles. La dégradation plus rapide du pyrène et du chrysène par rapport aux microcosmes précédents peut être attribuée à une diminution de la compétition métabolique entre les différents HAP présents. Certaines études ont rapporté une telle inhibition de la biodégradation due à la présence de plusieurs HAP dans une même culture (Bouchez *et al.*, 1995, Stringfellow et Aitken, 1995). Le fluorène a été rapporté comme un des HAP pouvant ralentir la biodégradation de HAP plus lourds parce qu'il était plus biodisponible et pouvait utiliser les mêmes voies enzymatiques.

Par contre, l'inoculation de microorganismes actifs provenant d'un microcosme dégradant les HAP n'a pas affecté de façon significative la biodégradation du pyrène et du chrysène. Ceci pourrait être attribuée au fait que le nombre de microorganismes actifs présents dans l'inoculum ajouté n'a pas été suffisant pour améliorer de façon significative l'activité de biodégradation. Une forte compétition pour des nutriments limités, pourrait également avoir affecté la survie de l'inoculum. Il est aussi probable que le prélèvement des cultures précédentes n'ait pas été effectué lorsque la viabilité des souches importantes était à son maximum.

1.2 Cultures liquides

Bien que les cultures en microcosmes se soient avérées d'excellents systèmes pour démontrer la biodégradation du chrysène, leur complexité physico-chimique et les temps d'incubation nécessaires limitent leur potentiel dans le cadre de cette étude. L'utilisation de cultures liquides contenant les quatre HAP et inoculées avec une suspension de microorganismes indigènes au sol de la sablière ont été considérées. Or, d'importantes pertes de HAP, particulièrement pour le chrysène, ont été observées dans les contrôles abiotiques des cultures liquides. Des problèmes similaires ont été observés lors des travaux précédents à cette étude (Lirette, 1996), puisque la concentration de chrysène diminuait subitement dans les contrôles abiotiques. Bien que dans le cas des travaux précédents, une biodégradation faible mais significative du chrysène ait pu être observée malgré ces pertes, il n'en a pas été ainsi pour la présente étude. La perte a été trop

importante pour conclure sur la biodégradation du chrysène par les bactéries de la sablière contaminée sous ces conditions.

Les causes probables de ces pertes ont été étudiées. L'absence de croissance bactérienne dans les contrôles abiotiques, malgré l'utilisation de divers milieux de croissance, a suggéré que les pertes pouvaient être attribuées au recouvrement des HAP lors des analyses quantitatives par chromatographie en phase gazeuse. Il s'est avéré que la sensibilité de l'appareil, envers les HAP, a diminué de façon très importante au cours de certaines de nos expériences. L'importante baisse de sensibilité de la colonne usagée, observée lors des évaluations de solutions de HAP, pourrait être attribuée aux multitudes analyses d'échantillons environnementaux effectuées par chromatographie gazeuse dans nos laboratoires. Ceci pourrait avoir causé une accumulation de substances hydrophobes sur la colonne, rendant ainsi la migration des HAP plus difficile ou emprisonnant une partie de ces derniers dans la colonne. L'utilisation constante de cet appareil semble avoir fortement contribué à la diminution rapide de sa sensibilité pour les HAP. Même en utilisant une colonne chromatographique neuve, la sensibilité de cette technique d'analyse pour le chrysène est significativement plus faible que pour les autres HAP (fluorène, phénanthrène et pyrène).

1.3 Nouvelles techniques de cultures

1.3.1 Problématique

Les résultats présentés jusqu'à maintenant indiquent que la très faible solubilité du chrysène pose des problèmes à plus d'un niveau. Cette faible biodisponibilité contribue à augmenter le temps nécessaire pour effectuer une biodégradation importante du chrysène. Ce composé se prête mal aux méthodes d'analyses habituelles. Les obstacles analytiques de la chromatographie en phase gazeuse couplés aux longues périodes d'incubation nécessaires pour effectuer une biodégradation significative du chrysène ont donc mené à envisager de nouvelles approches pour augmenter la solubilité du chrysène en culture et faciliter la quantification de la concentration de ce HAP lors des analyses.

1.3.2 Cultures liquides-acétonitrile

Dans un premier temps, la technique qui a permis à Caldini *et al.* (1995) d'effectuer la biodégradation d'une faible concentration de chrysène en deux jours a été utilisée. Cette technique consistait à ajouter, aux milieux de culture, le chrysène sous forme solubilisée dans l'acétonitrile, un solvant organique miscible avec l'eau. Une des principales raisons pour laquelle aucune biodégradation du chrysène n'a été observée dans ces cultures pourrait être que l'utilisation du solvant a sévèrement diminué le nombre et la diversité des bactéries viables dans les cultures, dont les souches capables de dégrader le chrysène (Tableau 7). Contrairement à Caldini *et al.* (1995) ainsi qu'à Abe *et al.* (1995), la population bactérienne utilisée dans les cultures liquides-acétonitrile n'était pas tolérante aux solvants organiques. Vermüe *et al.* (1993) ont rapporté que plusieurs microorganismes ne peuvent tolérer les solvants organiques à des concentrations supérieures à 0,1% (v/v). Dans le cas des cultures préparées dans le présent travail, des concentrations 50 fois supérieures à cette valeur ont été utilisées. Cette concentration, bien que toxique, a permis la dissolution d'une concentration minimale de chrysène détectable par CLHP sous nos conditions.

Finalement, contrairement à Caldini *et al.* (1995), le milieu liquide utilisé dans ces cultures ne contenait aucune autre source de carbone que le chrysène et le solvant organique. Malgré qu'ils aient rapporté une croissance nette de leur souche en présence de chrysène, ils n'ont pas fait mention du rôle, sur cette croissance, des sources supplémentaires de carbone qu'ils mettaient dans leurs milieux. Un tel ajout de nutriments dans les cultures liquides-acétonitrile aurait, peut-être, augmenté la croissance des souches tolérantes à ce solvant mais ces souches ne seraient pas nécessairement celles capable de dégrader le chrysène. Bien qu'intéressante, cette méthode n'a pas été retenue pour effectuer la biodégradation du chrysène par une population bactérienne mixte car la présence d'un solvant, même si ce dernier est accompagné d'une source de carbone accessible, diminue sérieusement le nombre de souches viables dans les cultures.

1.3.3 Cultures biphasiques

Pour pouvoir effectuer la biodégradation du chrysène dans un système plus simple que les microcosmes mais aussi plus performant, il fallait trouver une façon d'augmenter la solubilité du chrysène dans les cultures tout en limitant la toxicité et l'apport de carbone supplémentaire. L'approche des cultures biphasiques développée par Ascon-Cabrera et Lebault (1993), pour enrichir une population microbienne capable de dégrader diverses substances xénobiotiques non solubles, s'est avérée fort intéressante. Ils avaient choisi l'huile de silicone comme phase organique dans laquelle les substances à dégrader étaient solubilisées. Cette huile s'est avérée être un excellent choix pour la solubilisation du chrysène sans pour autant être toxique pour les microorganismes.

1.3.3.1 Mises au point analytiques

L'utilisation de l'huile de silicone comme phase organique s'est avérée être problématique au niveau des analyses quantitatives du chrysène. Ascon-Cabrera et Lebault (1993) ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse couplée à la détection d'ionisation par flamme (GC-FID) pour calculer les concentrations de leurs substances. Cette méthode s'est avérée être impraticable pour 3 raisons. Premièrement, comme mentionné précédemment, le GC-FID n'était pas très sensible à la détection du chrysène. Deuxièmement, malgré l'utilisation de différents solvants organiques, l'extraction du chrysène entraînait constamment des impuretés provenant de l'huile (silicones) qui possédaient les mêmes temps de rétention que le chrysène. Ceci a rendu impossible toute évaluation par ionisation. Finalement, la composition de la phase hydrophobe de la colonne chromatographique était identique à celle de l'huile de silicone (diméthyl polysiloxane). Ceci fut jugé potentiellement dommageable pour l'appareil et cette méthode n'a pas été retenue pour l'analyse. L'utilisation d'un autre type d'huile minérale aurait pu aider à contourner ce problème. Par contre, l'huile de silicone s'était avérée être un excellent milieu pour y dissoudre le chrysène sans pour autant fournir de sources de carbones supplémentaires aux microorganismes. Donc d'autres stratégies d'analyses ont été considérées.

L'utilisation de la spectrométrie de masse pour évaluer la concentration du chrysène extrait malgré la présence des impuretés n'a pas donné les résultats escomptés. Les concentrations élevées des impuretés ainsi que la co-migration de certains ions similaires à ceux du chrysène provenant des ces impuretés lors de la séparation chromatographique ont pu avoir rendu l'analyse des concentrations de ce HAP impraticable.

Vanneck *et al.* (1995), en adaptant la méthode des cultures biphasiques à l'étude de la biodégradation des HAP, ont utilisé la CLHP pour évaluer les concentrations de leurs composés. Une méthode similaire avait été mise au point et utilisée pour la quantification du chrysène solubilisé dans les cultures liquides-acétonitrile. Cette méthode a été facilement adaptable à l'évaluation des concentrations de chrysène extrait de l'huile de silicone. La détection par absorbance des rayons UV a permis une évaluation précise des concentrations de chrysène sans l'obstruction des impuretés qui n'absorbaient pas les rayons à la même longueur d'onde que les composés polycycliques. Une méthode de culture qui permettait d'augmenter la solubilité du chrysène tout en étant non toxique pour les microorganismes ainsi qu'une méthode d'analyse pour ce type de culture ont été développées et utilisées.

1.3.3.2 Biodégradation du chrysène en cultures biphasiques par une population bactérienne mixte

En utilisant les cultures biphasiques, Vanneck *et al.* (1995) ont observé la biodégradation de la presque totalité de concentrations importantes (200 mg/L) de HAP en 40 jours d'incubation. Parmi ces HAP figurait le benzo(a)pyrène qui possède une solubilité semblable au chrysène soit 0,0038 et 0,002 mg/L, respectivement, selon Mackay et Shiu (1977). Comme anticipé, nous avons obtenu une biodégradation presque complète du chrysène en cultures biphasiques où ce composé était l'unique source de carbone. Le taux de biodégradation dans ces cultures biphasiques inoculées avec une suspension de microorganismes de la sablière Thouin était similaire au taux observé pour le benzo(a)pyrène par Vanneck *et al.* (1995) et cette méthode de culture a été jugée très efficace pour étudier la dégradation du chrysène par une population bactérienne mixte.

L'activité de biodégradation du chrysène a été conservée lors de repiquages des microorganismes d'une culture biphasique active à de nouvelles cultures. La variation importante du temps nécessaire pour observer une activité significative d'un repiquage à l'autre a été attribuée au fait que les inoculums pouvaient être différents en termes de viabilité des bactéries impliquées dans la biodégradation du chrysène. Les repiquages ont été effectués de façon continue pendant plusieurs semaines de sorte à enrichir les microorganismes capables de dégrader le chrysène par rapport aux autres.

Parallèlement, des cultures biphasiques enrichies d'extraits de levures ont aussi été préparées car, lors de travaux précédents avec des cultures en microcosmes, une meilleure biodégradation des HAP a été démontrée avec cet ajout (Lirette, 1996). Contrairement à cette étude, aucune différence significative n'a été observée entre les cultures avec et sans ajouts. Ceci pourrait être dû au fait que le chrysène est beaucoup plus biodisponible en cultures biphasiques et qu'il est possiblement métabolisé de façon préférentielle par certaines bactéries. Tel qu'observé par Ascon-Cabrera et Lebeault (1995a, 1995b et 1993) ainsi que Efroymsen et Alexander (1994), une importante croissance de microorganismes a été obtenue à l'interface entre l'huile et le milieu liquide dans toutes les cultures biphasiques, y compris celles contenant de l'extrait de levures. Selon ces études, le taux de biodégradation des composés insolubles dépasse largement leur vitesse de solubilisation dans la phase aqueuse. Ils ont aussi observé que la vitesse de biodégradation dépend de la surface de contact entre les deux phases. Il semble donc exister, dans les cultures biphasiques, un mécanisme par lequel les microorganismes situés à l'interface peuvent aller chercher le chrysène sous forme solubilisée dans l'huile de silicone et ce malgré la présence d'une autre source de carbone, tel l'extrait de levures, déjà solubilisée dans le milieu aqueux.

L'utilisation des cultures biphasiques pour l'étude de la biodégradation de HAP lourds tel le chrysène s'avère être une méthode très efficace et rapide. Les taux de biodégradation et la forte croissance bactérienne observée dans ces cultures confirment qu'une augmentation de la biodisponibilité d'une substance récalcitrante peut accélérer

grandement sa dégradation par des microorganismes. Comme l'ont proposé Ascon-Cabrera et Lebault (1995a, 1993) ainsi que Vanneck *et al.* (1995), cette nouvelle approche devrait permettre l'étude de la biodégradation des substances récalcitrantes comme les HAP lourds ainsi que l'isolement de nouveaux microorganismes capables de les dégrader.

2. BIODÉGRADATION DES HAP PAR LES CHAMPIGNONS

2.1 Microcosmes

Des cultures en microcosmes contenant les quatre HAP (fluorène, phénanthrène, pyrène et chrysène) ont été préparées dans le but de favoriser la croissance des champignons indigènes à la sablière au détriment de la population bactérienne. Malheureusement, aucune conclusion sur la dégradation des HAP par les champignons n'a pu être effectuée dans ces conditions. La présence d'une croissance bactérienne forte, malgré l'ajout d'antibiotiques et l'acidification constante des milieux, pourrait être due à deux facteurs. D'une part, l'utilisation d'un milieu liquide très riche, tel que proposé par Launen *et al.* (1995) couplée à l'activité tampon du sol de la sablière, qui ramenait constamment le pH vers des valeurs neutres, auraient pu favoriser la croissance des bactéries au détriment des champignons. De l'autre, il est aussi probable que les doses d'antibiotiques utilisées n'ont pas été assez fortes pour inhiber complètement la croissance des bactéries du sol.

2.2 Cultures liquides

Afin d'éliminer la croissance bactérienne, ainsi que les variations de pH causées par le sol, des cultures liquides contenant de plus grandes concentrations d'antibiotiques ont été préparées et inoculées. Le milieu liquide utilisé a servi dans l'étude d'une souche de champignon isolée de la sablière contaminée lors de travaux précédents (Lirette, 1996) et était passablement moins riche que celui proposé par Launen *et al.* (1995) et Kiehlmann *et al.* (1996). Malgré des problèmes d'analyses similaires à ceux rencontrés lors des cultures liquides bactériennes, la biodégradation du fluorène et du phénanthrène a été observée. Contrairement aux études publiées par Kiehlmann *et al.* (1996), Launen *et al.* (1995) et Pothuluri *et al.* (1995), aucune biodégradation du pyrène ni du chrysène par

des champignons de la sablière contaminée aux hydrocarbures n'a été observée, et ce malgré une croissance visible de champignons dans toutes les cultures. Cette absence de biodégradation peut-être attribuée à la faible biodisponibilité des deux HAP à quatre cycles aromatiques ou au manque de souches capables de dégrader ces HAP plus récalcitrants dans les inoculums provenant de la sablière Thouin.

Launen *et al.* (1995) ont inoculé de petites quantités de sols contaminés sur des géloses riches contenant des antibiotiques. Puis, les colonies de champignons avaient été isolées et purifiées pour ensuite être testées pour leurs capacités d'oxyder les HAP lourds tels le pyrène et le benzo(a)pyrène. Malheureusement, nous n'avons pas tenté cette approche. Celle-ci aurait probablement pu nous aider à contourner les problèmes de contamination bactérienne et d'isolement de souches de champignons dégradant les HAP. Cette approche pourrait éventuellement faire l'objet d'investigations futures.

2.3 Cultures biphasiques

Face aux résultats obtenus avec la population bactérienne de la sablière en utilisant la méthode de cultures biphasiques, celle-ci a été adaptée pour évaluer si elle permettait aux champignons de dégrader ou d'oxyder le chrysène. Dans une de leurs études sur les cultures biphasiques, Ascon-Cabrera et Lebeault (1995a) ont adapté cette méthode pour étudier la biodégradation d'une substance toxique par un champignon. L'absence de biodégradation dans les cultures biphasiques pourrait indiquer que les champignons isolés de la sablière n'ont pas la capacité enzymatique pour dégrader le chrysène. De plus, contrairement aux cultures bactériennes, les cultures de champignons n'ont pas démontré de croissance à l'interface entre les deux phases. Dans leurs études, Ascon-Cabrera et Lebeault (1993, 1995a et 1995b) ont relié le taux de biodégradation à la quantité de microorganismes s'attachant à l'interface des deux phases. Ils ont aussi identifié l'hydrophobicité des cellules comme un facteur important dans l'attachement des microorganismes à l'interface entre l'huile de silicone et le milieu liquide. Il est donc aussi probable que les champignons retrouvés dans les cultures biphasiques n'aient pas eu les caractéristiques nécessaires, comme des cellules hydrophobes, pour s'attacher à l'interface et dégrader le chrysène directement dans la phase organique. Par conséquent,

les champignons de la sablière n'ont pas démontré, dans nos conditions en culture biphasique, la capacité de dégrader le chrysène, bien que certains semblent pouvoir dégrader les HAP plus légers, tel qu'observé dans les cultures liquides. Suite à ces résultats, l'étude des champignons a été délaissée pour continuer l'étude des cultures biphasiques bactériennes.

3. ÉTUDE DU CONSORTIUM BACTÉRIEN POUVANT DÉGRADER LE CHRYSÈNE EN CULTURES BIPHASIQUES

3.1 Enrichissement de la culture biphasique bactérienne dégradant le chrysène

Après plusieurs repiquages des cultures biphasiques contenant une population bactérienne dégradant le chrysène, des dilutions de ces cultures ont été effectuées. Les cultures ont été enrichies suite à des repiquages et des dilutions. Ces dilutions devaient permettre la diminution du nombre de souches présentes dans les cultures afin de faciliter l'isolement d'une ou des souches capables de dégrader le chrysène.

Lors de la première série de dilutions, la cultureensemencée avec l'inoculum dilué à 1/1000 a montré une biodégradation de la presque totalité du chrysène en 28 jours et ce taux de dégradation a été conservé dans les repiquages subséquents. Par contre, il faut noter que la culture non diluée a montré un taux de biodégradation particulièrement rapide, soit une dégradation complète en 14 jours. Cette activité rapide n'a pas été retrouvée dans les cultures dites enrichies par dilutions et repiquages successifs. Tel que discuté auparavant, le niveau de viabilité des bactéries dégradant le chrysène dans les inoculums prélevés lors des repiquages est probablement responsable des différents taux de l'activité de biodégradation rencontrée d'une culture à l'autre. L'utilisation d'inoculums standardisés aurait permis de limiter ce problème.

Ce phénomène est clairement évident lors de la deuxième série de dilutions qui a mené au développement du consortium chrysène (Figure 17). Dans toutes les cultures, y compris celles non diluées, une période de latence a été observée avant le début de l'activité de biodégradation. Dans ces dernières, il est fort probable que l'inoculum utilisé contenait une faible concentration de bactéries viables capables de dégrader le

chrysène. Cette population faible a tout d'abord du croître à un niveau suffisant pour coloniser l'interface et enclencher une dégradation rapide du chrysène. L'activité de dégradation du chrysène revenait à des taux semblables aux cultures de maintien non diluées après quelques repiquages.

Après la deuxième série de dilutions et le repiquage en continu du consortium bactérien issu de ces enrichissements, il a été convenu que des dilutions supplémentaires n'élimineraient pas plus de souches. Des étalements sur géloses, effectués après la deuxième série de dilutions ont montré que le nombre et la proportion des souches observables n'avaient pas vraiment changé par rapport à la première. Donc le consortium chrysène issue des deux séries de dilutions et repiqué plusieurs fois a été maintenu en cultures biphasiques et étudié.

3.2 Caractérisation du consortium

3.2.1 pH optimal

Contrairement à Dibble et Bartha (1979), qui ont établi le pH optimal pour la biodégradation des HAP à 7,8, le consortium chrysène a été plus performant à 7,0. Par contre, le consortium est resté actif en milieu alcalin en montrant une biodégradation du chrysène jusqu'à un pH de 8,0. Bien que, Wilson et Jones (1993) aient observé une activité à des valeurs de pH variant de 5,5 à 8,5, dans le cas du consortium chrysène, aucune dégradation n'a été observée à un pH inférieur à 6,5 et des cultures ayant des valeurs de pH supérieures à 8,0 n'ont pas été étudiées. Il semble donc que les souches du consortium, bien que plus actives en milieu neutre, comme l'a été la flore indigène du sol de la sablière (Lirette, 1996), sont aussi tolérantes à des milieux un peu plus alcalins.

3.2.1 Spectre de dégradation de HAP

Le consortium chrysène, même s'il a continuellement été maintenu en présence de chrysène, a aussi été en mesure d'effectuer la biodégradation presque complète de 100 mg/L de phénanthrène et de pyrène en 14 jours. Ceci est deux fois plus rapide que dans le cas du chrysène. C'est donc dire que le consortium a conservé sa capacité de dégrader

les HAP qui étaient dégradés par la microflore indigène de la sablière contaminée (Lirette, 1996).

Par contre, malgré des protocoles de cultures semblables à Vanneck *et al.* (1995) qui ont observé une biodégradation presque complète de 200 mg/L de benzo(a)pyrène après 40 jours d'incubation, aucune biodégradation significative de HAP ayant cinq cycles aromatiques et plus n'a été observée après 42 jours d'incubation. Cette absence d'activité peut être due au manque de microorganismes capables de dégrader les HAP à cinq cycles dans le consortium chrysène. L'enrichissement avec le chrysène a fort probablement favorisé la croissance de microorganismes capables de dégrader spécifiquement cette substance au détriment de ceux pouvant dégrader des HAP plus lourds. La biodisponibilité n'est probablement pas un facteur pouvant expliquer l'absence de dégradation des HAP à cinq cycles par le consortium chrysène compte tenu de l'utilisation de l'huile de silicone dans nos cultures.

3.2.3 Minéralisation du chrysène

La technique des cultures biphasiques a permis de mettre au point une méthode rapide et efficace pour étudier la dégradation du chrysène. Par contre, afin d'évaluer si une biodégradation complète du chrysène pouvait être effectuée par les bactéries du consortium, la technique de culture biphasique a dû être adaptée. Différentes études publiées ont montré la faisabilité de la combinaison des techniques de cultures biphasiques et de minéralisation pour étudier la biodégradation des HAP (Birman et Alexander, 1996 ; Ortega-Calvo *et al.* , 1995 ; Efroymoson et Alexander, 1995, 1994 et 1991). Plusieurs de ces études ont utilisé un système de captage du dioxyde de carbone pour évaluer sa radioactivité suite à la biodégradation de produits marqués par les microorganismes. Un tel système a été utilisé dans la présente étude et il a permis de démontrer que les bactéries du consortium chrysène peuvent minéraliser une partie du chrysène présent dans les cultures.

Une minéralisation d'environ 45% du chrysène marqué total a été observée après seulement 6 jours d'incubation dans les meilleures conditions. Sur la concentration

initiale de 10 mg/L de chrysène présent dans nos cultures la minéralisation correspond à environ 4,5mg/L, soit un taux de minéralisation d'environ 0,75 mg/L/jour. Pour leur part, Ye *et al.* (1996), dans des cultures liquides (potentiellement aidées par la présence d'acétone) ont observé un taux de minéralisation du chrysène d'environ 0,4 mg/L/jour par une souche pure. C'est donc dire qu'une minéralisation presque deux fois plus rapide du chrysène a été effectuée, sous nos conditions, par le consortium chrysène. Il aurait été intéressant d'effectuer un décompte de la radioactivité retrouvée dans les cellules du consortium pour évaluer la part de chrysène ayant servi de source de carbone lors de la croissance. Malheureusement la difficulté relative de séparer tous les microorganismes attachés à la surface de l'huile et les risques de contamination avec la radioactivité ont limité cette étude à l'évaluation du CO₂ produit.

Les différents taux de minéralisation observés entre les cultures effectuées en duplicata ont probablement été causés par l'ajout involontaire de faibles quantités de KOH concentré lors des manipulations. Cette hypothèse est supportée par le fait qu'aucune croissance visible n'a été observée dans les cultures qui montraient peu ou aucune minéralisation du chrysène contrairement aux autres cultures.

Les taux de minéralisation élevés ainsi que la croissance rapide et importante dans les cultures peuvent être attribués à des inoculums concentrés en microorganismes capables de dégrader le chrysène ainsi qu'à une plus grande surface de contact entre l'huile et le milieu liquide. Effectivement, la présence de la trappe à CO₂ dans les bouteilles de cultures brisait constamment la couche d'huile en gouttes se dispersant dans la phase liquide. Ceci a eu pour effet d'offrir plus de surface pour l'attachement des bactéries du consortium à la phase organique. Comme l'ont observé Ascon-Cabrera et Lebeault (1995a et 1995b) ainsi que Köhler *et al.* (1994), l'accroissement de la surface de contact augmente directement le taux de biodégradation du composé retrouvé dans la phase organique. Ceci permet donc à un plus grand nombre de microorganismes d'accéder aux substances présentes dans la phase organique. Cette hypothèse est supportée par le fait que les cultures biphasiques ne contenant pas de trappe à CO₂ n'affichaient pas une croissance aussi rapide et importante.

Basé sur ces résultats, un dispositif permettant de briser la phase d'huile en gouttelettes pourrait être ajouté aux cultures biphasiques afin d'améliorer leur performance. Ceci pourrait aussi aider dans la biodégradation de HAP plus lourds en offrant plus de chances aux microorganismes capables de dégrader ces substances de s'attacher à l'interface des deux phases et de croître en plus grand nombre et plus rapidement dans les cultures.

3.2.4 Souches du consortium

Six souches bactériennes ont été retrouvées dans le consortium chrysène. Les souches S1, S2 et S3 isolées du consortium chrysène ont été si nombreuses et leur croissance si rapide lors des dénombrements qu'elles ont été considérées comme les principales souches présentes dans ce consortium chrysène. L'absence de biodégradation du chrysène dans des cultures biphasiques inoculées avec chacune de ces trois souches a été attribuée à trois facteurs. Le premier pouvait être la perte de l'activité de biodégradation par les souches lors du passage sur le milieu solide qui ne contenait pas de chrysène. Le deuxième était que la souche dégradant le chrysène était présente dans le consortium en moins grands nombre que ces trois souches et possédait un taux de croissance plus lent. Finalement, il est possible que la biodégradation du chrysène se soit effectuée par co-métabolisme des souches ensemble. Les baisses d'activités observés lors des différents repiquages et dilutions pourrait être expliquer par ce phénomène de co-métabolisme.

Des dénombrements sur différents milieux solides et à des niveaux de dilutions plus élevées ont permis de mettre en évidence trois autres souches, soit S4, S5 et S6. Ces souches n'ont pas été testées en cultures biphasiques. Afin d'évaluer si certaines des 6 souches isolées du consortium chrysène avaient la capacité d'oxyder des HAP, ces derniers ont été vaporisés, selon Kiyohara *et al.* (1982), sur des géloses inoculées avec les cultures pures. Parmi les six souches, les souches S4 et S5 ont montré des zones d'éclaircissement autour du phénanthrène, un HAP plus biodisponible que le pyrène et le chrysène. Seule la souche S5 a formé des halos sur le pyrène et aucune n'a montré

d'éclaircissement du chrysène. La biodisponibilité très faible de ce dernier explique probablement pourquoi aucune zone d'éclaircissement n'a été observée. Il aurait fallu tester les souches actives, et plus particulièrement la souche S5, en cultures biphasiques afin de favoriser la biodisponibilité du chrysène. Un suivi par sondes moléculaires s'avérerait une approche alternative pour aider à la sélection des souches capable de dégrader le chrysène.

La présence de six souches bactériennes macroscopiquement différentes, et ce malgré les différents enrichissements effectués pour développer le consortium chrysène, semble indiquer qu'elles peuvent agir ensemble dans la biodégradation du chrysène. Il est possible que certaines souches puissent oxyder facilement le chrysène dans la phase organique, alors que d'autres utilisent les intermédiaires de dégradation qui sont plus solubles dans l'eau. Une telle coopération peut rendre l'isolement d'une souche problématique si la biodégradation ne s'effectue pas par une seule souche. Par contre, des observations microscopiques sur des prélèvements effectués dans la phase liquide et près de l'interface entre les deux phases d'une culture biphasique active, ont montré la présence des six souches dans des proportions similaires aux deux endroits.

4. ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DE HAP EN CULTURES BIPHASIQUES PAR DES SOUCHES DE COLLECTION.

Parallèlement aux études effectuées sur le consortium chrysène, des cultures biphasiques inoculées avec des souches bactériennes pures isolées lors de travaux précédents (Dagher *et al.* , 1997 ; Déziel, 1996) ont été étudiées. Ces souches sont reconnues pour leur capacité d'effectuer la biodégradation de certains HAP en milieu aqueux. Plus particulièrement, la souche 57 de *P. aeruginosa* dégradait le phénanthrène et la souche 107 de *Sphingomonas* était considérée comme particulièrement performante pour la dégradation du phénanthrène et du pyrène (Dagher *et al.* , 1996). Aucune de ces deux souches n'a démontré une biodégradation significative du chrysène en cultures biphasiques. Cette absence de dégradation avait alors été attribuée à la possibilité d'une perte de l'activité de dégradation des HAP par les souches ou à une absence des

mécanismes métaboliques nécessaires pour effectuer la biodégradation du chrysène, et ce malgré l'augmentation de la biodisponibilité de ce dernier.

Afin d'établir si les souches ont conservé leurs mécanismes enzymatiques de dégradation de certains HAP, portés sur des plasmides selon Dagher *et al.* (1996), des cultures biphasiques préparées avec le phénanthrène comme HAP ajouté à la phase organique ont été inoculées avec les deux souches de collection. Les deux souches ont été en mesure de dégrader rapidement le phénanthrène présent dans ces cultures biphasiques, confirmant qu'elles avaient conservé leur activité de dégradation de ce HAP.

Par contre, lorsque ces souches avaient été repiquées des cultures contenant le phénanthrène à des cultures biphasiques contenant du chrysène, aucune biodégradation significative de ce dernier n'a été observée. Deux facteurs pourraient expliquer ceci. Premièrement, il est possible qu'aucune des deux souches ne puisse dégrader le chrysène parce qu'elles n'ont pas les mécanismes enzymatiques nécessaires pour s'attaquer à ce HAP en particulier. Bien qu'elles soient en mesure de dégrader le phénanthrène en cultures biphasiques, elles ne peuvent probablement pas s'attaquer à la molécule de chrysène pour diverses raisons telles des incompatibilités entre la structure du chrysène et les enzymes des souches ou le manque d'un système de transport du chrysène permettant à la bactérie de prendre la substance solubilisée dans la phase organique. Deuxièmement, il est possible que ces souches ne soient pas assez hydrophobes pour s'attacher à l'interface entre les deux phases, un facteur considéré très important pour permettre la biodégradation selon Ascon-Cabrera et Lebeault. (1995a et 1995b).

Finalement, une étude du spectre de biodégradation des HAP en cultures biphasiques, semblable à celle effectuée pour le consortium chrysène, a été effectuée avec la souche 107 de *Sphingomonas* ainsi qu'avec une autre souche du même genre, la *Sphingomonas* 105. Ces souches ont été retenues car elles sont considérées particulièrement performantes dans la dégradation de HAP tels le phénanthrène et le pyrène en milieu liquide (Déziel, 1996). L'étude a révélé que les deux souches pouvaient dégrader très rapidement le phénanthrène. La dégradation plus rapide du phénanthrène

que du pyrène par les deux souches en cultures biphasiques pourrait s'expliquer non par leur biodisponibilité mais par la structure et la complexité des molécules. L'absence de biodégradation de HAP plus lourd semble indiquer que ces souches n'ont pas les capacités de s'attaquer au chrysène ainsi qu'aux HAP plus lourds tels le benzo(a)pyrène et le pérylène sous nos conditions de cultures.

Donc, l'augmentation de la biodisponibilité par l'utilisation de nouvelles méthodes de cultures, bien qu'importante pour l'amélioration de la dégradation de produits récalcitrants par certains microorganismes, ne semble pas être le seul facteur qui limite leur biodégradation. D'autres facteurs, comme des enzymes spécifiques aux structures particulières ou imposantes de ces HAP lourds, l'hydrophobicité des cellules ainsi que des systèmes de transports spécifiques à ces substances, semblent entrer en jeux lors de la biodégradation de HAP plus lourds ou moins biodisponibles.

Conclusion

Les traitements biologiques des sols, bien qu'avantageux sur le plan économique et écologique, se retrouvent parfois d'une efficacité limitée face à des sols contaminés par des polluants lourds et peu solubles comme les hydrocarbures polycycliques aromatiques. Ce travail portait sur l'étude de la biodégradation du chrysène, un HAP lourd modèle, en utilisant des techniques alternatives de cultures afin d'augmenter sa biodisponibilité. Le présent travail m'a permis d'effectuer les conclusions suivantes :

- 1) La sablière Thouin, un site fortement contaminé aux hydrocarbures tels les HAP, possède une microflore bactérienne capable d'effectuer la biodégradation du chrysène.
- 2) Des cultures liquides contenant de l'acétonitrile, un solvant organique, afin d'augmenter la concentration de chrysène solubilisé n'ont pas donné de résultats positifs. Ce solvant s'est avéré toxique pour les microorganismes et la concentration du chrysène solubilisé dans ces cultures atteignait à peine le seuil de sensibilité de la technique de détection.
- 3) Une technique utilisant des cultures biphasiques, où l'huile de silicone agissait comme phase organique dans laquelle les HAP peuvent être facilement dissous, a permis d'accélérer la biodégradation du chrysène.
- 4) Une technique d'analyse de type CLHP permettant d'améliorer le suivi de la biodégradation des HAP a été mise au point. L'utilisation de cette technique en tandem avec les cultures biphasique s'est avérée être une façon rapide et précise d'étudier la biodégradation du chrysène.
- 5) L'utilisation de cultures biphasiques inoculées avec la flore indigène de la sablière Thouin a permis d'accélérer, de façon étonnante, le taux de biodégradation du chrysène. En microcosmes, la microflore avait dégradée une concentration de 100 ppm de chrysène en 90 jours tandis qu'en cultures

biphasiques, cette même microflore avait complétée la biodégradation d'une concentration identique de chrysène en 14 jours.

- 6) Les cultures biphasiques ont permis l'isolement d'un consortium bactérien enrichi capable d'effectuer une dégradation rapide et complète du chrysène. Ce consortium dégrade rapidement le phénanthrène, le pyrène et le chrysène de façon optimale en milieu neutre. Par contre, aucune biodégradation du benzo(a)pyrène et du pérylène n'a été observée.
- 7) Le consortium est composé d'au moins six souches bactériennes différentes, majoritairement Gram négative et ayant toutes des formes de bâtonnets. Deux des six souches peuvent créer des zones d'éclaircissement sur des géloses vaporisées avec du phénanthrène et l'une d'elle peut aussi créer des zones sur le pyrène. Ceci suggère qu'elles peuvent oxyder ces substances. Par contre, la ou les souches responsables de la biodégradation du chrysène n'ont pas été isolées.
- 8) Les souches bactériennes de collections utilisées, bien qu'elles aient gardé leurs capacités de dégrader certains HAP comme phénanthrène et le pyrène, ne dégradent pas le chrysène, le benzo(a) pyrène ou le pérylène en cultures biphasiques, sous les conditions utilisées.
- 9) Contrairement aux bactéries, les champignons de la sablière Thouin, bien qu'ils dégradent certains HAP plus légers, n'ont pas été capables de dégrader le chrysène sous nos conditions.
- 10) L'augmentation de la biodisponibilité du chrysène par l'utilisation de cultures biphasiques, bien qu'importante pour l'amélioration de sa dégradation par certains microorganismes, n'est pas le seul facteur qui limite leur performance. D'autres facteurs, comme des enzymes spécifiques aux structures particulières ou imposantes des HAP lourds, l'hydrophobicité des cellules ainsi que des

systemes de transports spécifiques à ces substances, pourraient influencer la biodégradation de ces composés peu biodisponibles.

Remerciements

Pour la réalisation de ce travail, je tiens à remercier les personnes suivantes :

D^r Jean-Guy Bisaillon, mon directeur de recherche, pour sa vision, son support et sa patience tout au long de ce travail.

Louis Racine, Sylvain Milot et Guy McSween pour l'aide technique, les conseils, et leur dynamisme.

Eric Deziel pour son aide constante, surtout en fin de parcours.

D^r François Lépine, D^r Richard Villemur et D^r Réjean Beaudet pour leurs conseils et leurs opinions.

D^r Michael H. DuBow et D^r David H. Macfarland pour m'avoir initié aux joies et aux réalités de la science.

Et un remerciement tout spécial à Alexandra Gladu, pour sa présence dans ma vie et qui m'offre toujours amour, support et compréhension.

Bibliographie

Abe, A.; Inoue, A; Usami, R; Moriya, K et Horikoshi, K. 1995. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by organic solvent-tolerant bacteria from deep sea. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 1154-1156.

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

Amin, S., Huie, K.; Melikian, A.A.; Leszczynska, J.M; et Hecht, SS. 1985. Comparative metabolic activity in mouse skin of the weak carcinogen 6-methylchrysene and the strong carcinogen 5-methylchrysene. *Cancer Res.* 45: 6406-6412.

Anonyme. 1988. Politique de réhabilitation des terrains contaminés. Gouvernement du Québec. Publications du Québec. 54 pages.

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

Ascon-Cabrera, M. et Lebeault, J.M.. 1993. Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1717-1724.

Ascon-Cabrera, M. et Lebeault, J.M. 1995a. Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 1136-1141.

Ascon-Cabrera, M. et Lebeault, J.M. 1995b. Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system. *J. Ferment. Bioeng.* 80 : 270-275

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

Atlas, R.M., et Cerniglia, C.E. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants : Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. *BioSciences.* 45 : 332-338.

Beaulieu, M., et Drouin, R. 1998. Politique de protections des sols et de réhabilitation des terrains contaminés. Gouvernement du Québec. Les Publications du Québec. 124 pages.

Berkowitz, J.B. et Farkas, A.L. 1992. Commercializing innovative cleanup technologies. *Environ. Sci. Technol.* 26 : p247.

Birman, I. et Alexander, M. 1996. Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 : 267-272.

Boethling, R.S. 1984. Biodegradation testing of insoluble chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 3 : 5-7.

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

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

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

Bouchez, M.; Blanchet, D. et Vandecasteele, J.P. 1996. The microbiological fate of polycyclic hydrocarbons : Carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45 : 556-561.

Braddock, J.F.; Lindstrom, J.E. et Brown, E.J. 1995. Distribution of hydrocarbon-degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska, following the *Exxon Valdez* oil spill. *Marine Pollution Bulletin.* 30 : 125-132.

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

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

Carman, K.R.; Means, J.C. et Pomarico, S.C. 1996. Response of sedimentary bacteria in a Louisiana salt marsh to contamination by diesel fuel. *Aquatic Microbial Ecology.* 10 : 231-241.

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

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

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

Cheung, Y-L; Gray, T.J.B, et Ioannides, C. 1993. Mutagenicity of chrysene, its methyl and benzo derivatives, and the interactions with cytochromes P450 and the Ah-receptor; relevance to their carcinogenic potency. *Toxicol.* 81: 69-86.

Coates, J.D.; Anderson, R.T. et Lovely, D.R. 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1099-1101.

Collins, LD et Daugulis, A.J. 1996. Use of two phase partitioning bioreactors for the biodegradation of phenol. *Biotechnol. Tech.* 10: 643-648

Dagher, F.; Déziel, E; Lirette, P.; Paquette, G.; Bisaillon, J.G. et Villemur, R. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Can. J. Microb.* 43: 368-377.

Déziel, E. 1996. Étude de la production de biosurfactants par des souches bactériennes métabolisant les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire maîtrise microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier. 248 pages.

Déziel, E.; Paquette, G.; Villemur, R.; Lépine, F. et Bisaillon, J.G. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1908-1912.

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

- Efroymson, R.A. et Alexander, M. 1991. Biodegradation by an *Arhtrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1441-1447.
- Efroymson, R.A. et Alexander, M. 1994. Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* 28: 1172-1179.
- Efroymson, R.A. et Alexander, M.. 1995. Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* 29: 515-521.
- Ellis, B.; Harold, P. et Kronberg, H. 1991. Bioremediation of a creosote contaminated site. *Environ. Technol.* 12: 447-459.
- Fu, M.H. et Alexander, M.. 1995. Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 551-558.
- Guha, S. et Jaffé, P.R. 1996. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30: 605-611.
- Grimberg, S.J.; Nagel, J. et Aitken, M.D. 1995. Kinetics of phenanthrene dissolution into water in the presence of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 29: 1480-1487.
- Haigler, B.E. et Gibson, D.T. 1990. Purification and properties of NADH-ferrodoxine NAP reductase, a component of naphtalène dioxygenase from *pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 172: 457-464.

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

Heitkamp, M.A.; Freeman, J.P.; Miller, D.W. et Cerniglia, C.E. 1988b. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from pristine water ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1968-1973.

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

Hites, R.A.; LaFlamme, R.E. et Farrington, J.W. 1977. Sedimentary polycyclic aromatic hydrocarbons : the historical record. *Science.* 198 : 829-831.

Inoue, A. et Horikoshi, K. 1991. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log. *P. J. Ferment. Bioeng.* 71 : 194-196.

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

Jimenez, I.Y. et Bartha, R. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 2311-2316.

Kästner, M., et Mahro, B.. 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44 : 668-675.

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

Kiehlmann, E.; Pinto, L. et Moore, M. 1996. The biotransformation of chrysene to *trans*-1,1-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene by filamentous fungi. *Can. J. Microbiol.* 42: 604-608.

Kiyohara, H.; Nagao, K.; Kouno, K. et Yano, K. 1982. Phenanthrene degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AKK2. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 458-461.

Köhler, A.; Schüttorf, M.; Bryniok D. et Knackmuss H.J. 1994. Enhanced biodegradation of phenanthrene in biphasic culture systems. *Biodegradation.* 5: 93-103.

Kotterman, M.J.J.; Wasseveld, R.W. et Field J.A. 1996. Hydrogen peroxide production as a limiting factor in xenobiotic compound oxidation by nitrogen-sufficient cultures of *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 overproducing peroxidases. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 880-885.

Labare, M.P. et Alexander, M. 1995. Enhanced mineralization of organic compounds in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 257-265.

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

Launen, L.; Pinto, L.; Wiebe, C.; Kiehlmann, E et Moore, M. 1995. The oxidation of pyrene and benzo(a)pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can. J. Microbiol.* 41: 477-488.

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

Leduc, R.; Samson, R; Al-Bashir, B. ; Al-Hawari, J et Cseh, T. 1992. Biotic and abiotic disappearance of four PAH compounds from flooded soil under various redox conditions. *Water Sci. Technol.* 26: 51-60.

Li, X.F.; Cullen, W.R.; Reimer K.J. et Le, X.C. 1996. Microbial degradation of pyrene and characterization of a metabolite. *Sci. Total Environ.* 177: 17-29.

Lirette, P. 1996. Optimisation de la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Mémoire de maîtrise en microbiologie appliquée. Institut Armand-Frappier. 175 pages.

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

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

Mahro, B.; Schaefer, G. et Kästner, M. 1994. Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Dans : Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. Ed : Hinche, A.R., E. Leeson, L. Semprini et S.K. Ong. Lewis. Boca Raton. 203-217.

Martel, R. et Aubé, P. 1998. Inventaire des lieux d'élimination de résidus industriels GERLED : Évolution depuis 1983 et état actuel. Les Publications Du Québec. 62 pages.

Meek, M.E., Chan, P.K.L. et Bartlett, S. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons : evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcino. Ecotox. Revs.* C12: 443-452.

Means, J.C.; Ward S.G.; Hasset, J.J et Banwart, W.L. 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14: 1524-1528.

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

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

Mihelcic, J.R.; Lueking, D.R.; Mitzell, R.J. et Stapleton, J.M. 1993. Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. Biodegradation. 4: 141-153.

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

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

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

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

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

Ortega-Calvo, J.J.; Birman, I. et Alexander, M. 1995. Effect of varying the rate of partitioning of phenanthrene in non-aqueous-phase liquids in soil slurries. *Environ. Sci. Technol.* 29: 2222-2225.

Parker, W.J. et Monteith, H.D. 1995. Fate of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons during anaerobic digestion of municipal wastewater sludges. *Water Environ. Res.* 67: 1052-1059

Paszczynski, A. et Crawford, R.L. 1995. Potential for bioremediation of xenobiotic compounds by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnol. Prog.* 11: 368-379.

Perry, J.J. 1977. Microbial metabolism of cyclic hydrocarbons and related compounds. *Crit. Rev. Microbiol.* 5:387-412.

Pothuluri, J.V.; Selby, A.; Evans, F.E.; Freeman, J.P. et Cerniglia, C.E. 1995. Transformation of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Can. J. Bot.* 73(suppl. 1): S1025-S1033.

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

Providenti, M.A.; Greer, C.W.; Lee, H. et Trevors, J.T. 1995a. Phenantrene mineralisation by *Pseudomonas* sp. UG14. *World J. Microbiol. Biotech.* 11: 271-279.

Providenti, M.A.; Flemming, C.A.; Lee, H. ; et Trevors, J.T. 1995b. Effect of addition of rhamnolipid biosurfactans or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 17: 15-26.

Rouse, J.D.; Sabatini, D.A.; Suflita, J.M. et Harwell, J.H. 1994. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 24: 325-370.

Sanglard, D.; Leisola, M.S.A.A et Fiechter, M.S.A. 1986. Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme microb. Technol.* 8: 209-212.

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

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

Schaffer, T.L.; Cantell, S.G.; Brown, J.L.; Watt, D.S. et Fall, R.R. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 742-746.

Schneider, J.; Grosser, R.; Jayasimhulu, K.; Xue, W. et Warshawsky, D.. 1996. Degradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by *mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:13-19.

Scribner, J.D. 1973. Brief communication : tumor initiation by apparently noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 50: 1717-1719.

Sheu, C.W.; Dobras, S.N.; Rodrigez, I.; Lee, J.K. et Fu, P.P. 1994. Transforming activity of selected polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro-derivatives in BALC/3T3 A31-1-1 cells. *Fd. Chem. Toxic.* 7: 611-615.

Shuttleworth, K.L. et Cerniglia, C.E. 1996. Bacterial degradation of low concentration of phenanthrene and inhibition by naphthalene. *Microb. Ecol.* 31: 305-317.

Sims, P. 1970. Qualitative and quantitative studies on the metabolism of a series of aromatic hydrocarbons by rat liver preparations. *Biochem. Pharmacol.* 19: 795-818.

Sims, J.L.; Sims, R.C. et Matthews, J.E. 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazard Waste Hazard Matter.* 7: 117-149.

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

Siron, R.; Pelletier, É. et Brochu, C. 1995. Environmental factors influencing the biodegradation of petroleum hydrocarbons in cold seawater. *Arch. Enviro. Contam. Toxicol.* 28: 406-416.

Stegman, R.; Lotter, S. et Heerenklage, J.. (1991). Biological treatment of oil-contaminated soils in bioreactors. Dans : On-site bioreclamation. Ed : Hinche R.E. et R.F. Olfenbutel. Butterworth-Heinemann. Boston. 188-208.

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

Thaker D.R.; Yagi, H.; Levin, W.; Wood, W.A.; Conney, A.H et Jerina, D.M. 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons : Metabolic activation to ultimate carcinogens. Dans : Bioactivation of Foreign Compounds. Ed. M.W. Anders. Academic Press, Orlando : 177-242.

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

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

Thibault, S.I.; Anderson, M. et Frankenberger W.T. jr. 1996. Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 283-287.

Thomas, J.M.; Yordy, J.R.; Amador, J.A. et Alexander, M. 1986. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 52 : 290-296.

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

Tsomides, H.J.; Hughes, J.B.; Thomas, J.M. et Ward, C.H. 1995. Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. Environ. Toxicol. Chem. 14 : 953-959.

Vanneck, P.; Beeckman, M.; De Saeyer, N; D'Haene, S. et Verstraete, W. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid-phase system. Dans : Bioremediation of recalcitrant organics. Ed. R. E. Hincsee, D. B. Anderson et R. E. Hoepfel. 7 : 56-63.

Venosa, A.D.; Suidan, W.T.; Wrenn, B.A; Strohmeier, K.L; Haines, J.B.; Eberhart, B.L.; King, D. et Holder, E. 1996. Bioremediation of an oil spill on the shoreline of Delaware Bay. Environ. Sci. Technol. 30 : 1764-1775

Vermuë, M.; Sikkema, J.; Verheul, A.; Baker, R. et Tramper, J. 1993. Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* et *Pseudomonas* sp. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 747-758.

Volkering, F.; Breuke, A.M.; Van Andel, J.G. et Rulkens, W.H. 1995. Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1699-1705.

Walker, J.D. et Colwell, R.R. 1976. Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 189-197.

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

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

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

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

Wood, A.W.; Levin, W.; Ryan, D.; Thomas, P.E.; Yagi, H.; Mah, H.D.; Thaker, D.R.; Jerina, D.R. et Conney, A.H. 1977. High mutagenicity of metabolically activated chrysene 1,2-dihydrodiol: Evidence for bay region activation of chrysene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 847-854.

Ye, Dingyi; Akmal Siddiqi, M; Maccubin, A.E.; Kumar, S. et Sikka, H.C. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. Environ. Sci. Technol. 30: 136-142.

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

ZoBell, C.E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol. Rev. 10: 1-49.

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