

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Étude de la diversité d'un consortium bactérien capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un système biphasique

Par
Isabelle Lafortune

Mémoire
Présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Examineur interne	Réjean Beaudet, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Charles W. Greer, Ph.D. Institut de recherche en biotechnologie
Directeur de recherche	Richard Villemur, Ph.D. INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

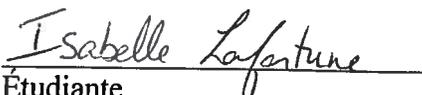
Plusieurs sols sont contaminés par des hydrocarbures provenant d'activités industrielles. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants issus de la combustion de matière carbonée et sont retrouvés comme sous-produits de raffineries. Certains de ces HAP, principalement les HAP de haut poids moléculaire (HAP HPM), ont un potentiel mutagène et cancérigène. Par contre, ces HAP sont très peu disponibles pour les microorganismes capables de les dégrader, car ils sont très hydrophobes et s'attachent aux particules du sol. Une méthode intéressante pour augmenter la biodisponibilité des HAP HPM est l'utilisation de systèmes biphasiques. Dans ces systèmes, il y a une phase hydrophobe dans laquelle sont dissous les HAP et ces HAP peuvent diffuser progressivement vers la phase aqueuse où les bactéries peuvent les dégrader.

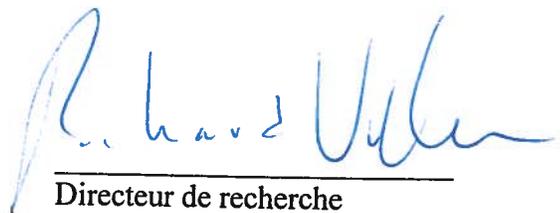
Les buts de ce projet de recherche ont été d'étudier un consortium bactérien dégradant les HAP dans un système biphasique afin de déterminer et caractériser les espèces bactériennes présentes, de déterminer l'effet de l'ajout de HAP de faible poids moléculaire sur la dégradation des HAP HPM et sur la diversité du consortium, et finalement de vérifier la présence de certains gènes de dégradation de composés aromatiques.

Pour identifier les bactéries présentes dans ce consortium, une génothèque d'ADNr 16S a été générée et les inserts de différents clones ont été séquencés. Les résultats ont révélé que la majorité des clones sont affiliés aux classes des *alpha*- et des *beta*-protéobactéries. D'ailleurs, plusieurs des genres bactériens identifiés dans le consortium, par exemple *Achromobacter* sp., *Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp. et *Paracoccus* sp., ont déjà été liés à la dégradation des HAP. De plus, la diversité du consortium a été étudiée par culture sur gélose. Par cette méthode, 11 souches ont été identifiées suite au séquençage de l'ADNr 16S. Les expériences ont d'ailleurs montré que la souche S9, affiliée au genre *Novosphingobium*, peut dégrader le pyrène et le chrysène dans un système biphasique.

L'ajout de HAP de faible poids moléculaire a eu, en général, un effet stimulateur sur la dégradation des HAP HPM, principalement sur le benzo[*a*]pyrène. Il a pu aussi être déterminé, par PCR-DGGE, que certaines espèces bactériennes, affiliées aux Bacteroidetes, aux *Sphingomonas* sp. et aux *Achromobacter* sp., ont été particulièrement privilégiées suite à cet ajout.

Dans le consortium, la présence de certains gènes de dégradation de composés aromatiques a aussi été évaluée par PCR à l'aide d'amorces dégénérées. Les essais ont montré la présence de trois types de dioxygénases, soit une catéchol 2,3-dioxygénase (gène *xyIE*), une 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase (gène *bphC*) et une autre dioxygénase (gène *nidA*) principalement retrouvée chez les mycobactéries.


Étudiante


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je désire tout d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Richard Villemur, pour sa grande confiance et sa disponibilité, ses nombreux conseils et pour son excellent encadrement tout au long de mon projet. Durant ma maîtrise, il m'a offert l'opportunité de participer à plusieurs événements et projets et je lui en suis très reconnaissante.

Je tiens aussi à dire un grand merci à tous les étudiants du groupe de recherche en microbiologie de l'environnement que j'ai côtoyés durant ce projet pour les intéressantes discussions, les conseils, les encouragements et l'atmosphère de travail inoubliable.

J'aimerais de plus remercier tous les membres du groupe de recherche en microbiologie de l'environnement pour leurs nombreux conseils de même que pour le soutien technique.

Je profite de l'occasion pour remercier la Fondation Armand-Frappier et le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs pour leur soutien financier au cours de mes études graduées.

Finalement, je désire grandement remercier ma famille pour leur confiance, pour tous les encouragements et leur appui constant à mon égard durant ce projet.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS	xi
1. INTRODUCTION	1
2. REVUE DE LITTÉRATURE	5
2.1 <i>Les hydrocarbures aromatiques polycycliques</i>	6
2.1.1 Structure des HAP	6
2.1.2 Réglementation	7
2.1.3 Origines et sources des HAP	7
2.1.4 Propriétés physico-chimiques	8
2.1.5 Toxicité	9
2.2 <i>Microorganismes dégradant les HAP</i>	10
2.2.1 Champignons et algues	10
2.2.2 Bactéries	11
2.3 <i>Voies de dégradation des HAP et gènes impliqués</i>	14
2.3.1 Voie de dégradation chez les champignons	14
2.3.2 Voie de dégradation bactérienne	16
2.3.3 Gènes et enzymes impliqués dans la dégradation des composés aromatiques	21
2.3.4 Inducteurs de la dégradation des HAP	24
2.4 <i>Traitement des sols contaminés par les HAP</i>	25
2.4.1 Traitements non-biologiques	26
2.4.2 Traitements biologiques	26
2.5 <i>Systèmes biphasiques</i>	27
2.5.1 Caractéristiques d'un système biphasique	27
2.5.2 Prise du substrat par les bactéries	29
2.5.3 La sélection de la phase hydrophobe	29
2.5.4 Le taux de transfert de masse	30
2.5.5 Choix des microorganismes	31
2.6 <i>Conclusion et rappel des objectifs</i>	32

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
3.1 <i>Systèmes biphasiques</i>	34
3.1.1 HAP	34
3.1.2 Extrait de sol	34
3.1.3 Systèmes biphasiques	35
3.1.4 Enrichissement	36
3.1.5 Conservation du consortium	36
3.2 <i>Extraction et dosage des HAP</i>	36
3.2.1 Extraction des HAP dans l'huile de silicone	36
3.2.2 Analyse au HPLC	37
3.3 <i>Le dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)</i>	37
3.4 <i>Techniques de biologie moléculaire</i>	38
3.4.1 Extraction d'ADN	38
3.4.2 Électrophorèse sur gel d'agarose	39
3.4.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	40
3.4.4 Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)	41
3.5 <i>Élaboration d'une génothèque d'ADNr 16s</i>	44
3.5.1 Purification des produits de PCR servant au clonage	44
3.5.2 Ligation et transformation	45
3.5.3 Extraction d'ADN plasmidique et détection de faux-positifs	47
3.5.4 Criblage des clones	48
3.6 <i>Extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide</i>	49
3.7 <i>Séquençage et analyse des séquences</i>	49
3.7.1 Élimination des chimères	50
3.7.2 Étude phylogénétique	50
3.8 <i>Test de dégradation des HAP et profils de diversité</i>	51
3.9 <i>Effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM et sur la diversité du consortium</i>	51
3.10 <i>Isolement et caractérisation de microorganismes provenant du consortium</i>	52
3.10.1 Isolement de différentes colonies	52
3.10.2 Identification des souches	52
3.10.3 Test de vaporisation de HAP sur gélose	52
3.10.4 Test de l'indole	53
3.10.5 Reconstitution d'un consortium	54
3.11 <i>Détection de gènes de dégradation de produits aromatiques</i>	55
3.11.1 Conception et synthèse des amorces	55
3.11.2 Amplification des gènes de dégradation et séquençage	56
4. RÉSULTATS	59
4.1 <i>Étude de la dégradation des HAP dans les systèmes biphasiques</i>	60
4.1.1 Cinétique de dégradation des HAP et profil de diversité du consortium	60

4.1.2 Étude de la dégradation des HAP seuls et profils de diversité associés	62
4.2 Détermination de la DCO de l'extrait de sol 10%.....	68
4.3 Caractérisation du consortium bactérien.....	69
4.3.1 Identification des bactéries au moyen d'une génothèque d'ADNr 16S.....	69
4.3.2 Identification bactérienne par extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide ...	70
4.3.3 Caractérisation de bactéries du consortium par la culture sur gélose	74
4.3.4 Étude phylogénétique des bactéries identifiées dans le consortium bactérien..	77
4.4 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM et la diversité bactérienne présente dans les systèmes biphasiques.....	82
4.4.1 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM.....	82
4.4.2 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la diversité bactérienne.....	82
4.5 Détection de gènes de dégradation de produits aromatiques.....	86
4.6 Étude de la capacité de dégradation des souches caractérisées	88
4.6.1 Étude de la dégradation et de la diversité d'un consortium reconstitué.....	88
4.6.2 Étude de la dégradation des HAP HPM chez la souche S9	89
5. DISCUSSION	93
5.1 Étude de la dégradation des HAP dans les systèmes biphasiques.....	94
5.2 Caractérisation du consortium bactérien.....	97
5.3 Caractérisation des souches isolées sur gélose	103
5.4 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM et la diversité du consortium.....	104
5.5 Détection de gènes de dégradation de produits aromatiques.....	105
5.6 Étude de la capacité de dégradation des souches caractérisées	108
6. CONCLUSION	111
RÉFÉRENCES.....	115

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Solubilité, poids moléculaire et nombre de cycles benzéniques de quelques HAP.....	9
Tableau 3.1 Amorces utilisées lors des amplifications par PCR sur l'ADNr 16S ou des gènes de dégradation de composés aromatiques.....	57-58
Tableau 4.1 Résultats d'identification des clones présents dans la génothèque d'ADNr 16S.....	71-72
Tableau 4.2 Résultats d'identification des souches isolées lors de la culture sur gélose.....	75
Tableau 4.3 Caractérisation des souches isolées du consortium étudié et de deux souches témoins par rapport aux tests de vaporisation de HAP sur gélose et au test de l'indole.....	76
Tableau 4.4 Détection et identification de certains gènes de dégradation de composés aromatiques chez certaines souches et dans le consortium.....	87

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Structure moléculaire des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques classés comme polluants prioritaires par le USEPA.....	6
Figure 2.2	Voie de dégradation des HAP chez les champignons et les bactéries.....	15
Figure 2.3	Voie de dégradation du NAP.....	18
Figure 2.4	Voies de dégradation du PYR chez les bactéries.....	19
Figure 2.5	Voie de dégradation du BAP chez <i>Mycobacterium</i> sp. RJGII-135.....	20
Figure 2.6	Plasmide NAH7 impliqué dans la dégradation du NAP chez <i>Pseudomonas putida</i> G7.....	22
Figure 2.7	Arrangement transcriptionnel des gènes <i>nah</i> , régulation des deux opérons par le gène <i>nahR</i> et induction possible par la salicylate.....	22
Figure 2.8	Oxydation initiale du naphthalène par la NAP dioxygénase.....	23
Figure 2.9	Schéma d'un système biphasique.....	28
Figure 3.1	Appareillage et montage employé lors de la préparation d'un gel à gradient dénaturant utilisé dans la technique du DGGE.....	43
Figure 3.2	Vecteur pGEM [®] -T Easy utilisé dans l'étape de ligation lors du clonage des différents ADN _r 16S amplifiés par PCR.....	46
Figure 4.1	Suivi de la dégradation des différents HAP présents dans les systèmes biphasiques durant 49 jours.....	61
Figure 4.2	Profils de la diversité bactérienne présente dans la phase aqueuse et à l'interface dans les systèmes biphasiques étudiés.....	62
Figure 4.3	Cinétique de dégradation du PYR dans les systèmes biphasiques.....	64
Figure 4.4	Profil de la diversité bactérienne dégradant le PYR dans la première et la quatrième cultures.....	65
Figure 4.5	Cinétique de dégradation du CHY dans les systèmes biphasiques.....	66
Figure 4.6	Profil de la diversité bactérienne dégradant le CHY dans la culture de départ, la culture du premier repiquage et du troisième repiquage.....	67

Figure 4.7	Courbe standard de la densité optique à 600nm obtenue à différentes concentrations d'acide phtalique de potassium (KHP).....	68
Figure 4.8	Association des bandes observées sur DGGE aux clones identifiés par séquençage de leur ADNr 16S.....	73
Figure 4.9	Classification phylogénétique des alphaprotéobactéries.....	79
Figure 4.10	Classification phylogénétique des betaprotéobactéries.....	80
Figure 4.11	Classification phylogénétique des Bacteroidetes.....	81
Figure 4.12	Effet de l'ajout de HAP FPM, tels le NAP et le PHE, sur la dégradation du PYR, du CHY et du BAP dans les systèmes biphasiques.....	84
Figure 4.13	Évolution de la diversité bactérienne présente dans les systèmes biphasiques suite à l'ajout de NAP et de PHE.....	85
Figure 4.14	Cinétique de dégradation du PYR et du CHY dans les différents systèmes biphasiques.....	90
Figure 4.15	Profils de la diversité bactérienne retrouvée dans les différents systèmes biphasiques après 27 jours d'incubation.....	91
Figure 4.16	Cinétique de dégradation du PYR et du CHY dans les différents systèmes biphasiques pour vérifier la présence de cométabolisme.....	92

LISTE DES SIGLES ET DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomal
ANT	Anthracène
ARN	Acide ribonucléique
BAA	Benz[<i>a</i>]anthracène
BAP	Benzo[<i>a</i>]pyrène
BH	Milieu de sels minéraux Bushnell-Haas
BHY	Milieu BH supplémenté de 0.05% d'extrait de levure
BSA	Sérum d'albumine bovine
CHY	Chrysène
DCM	Dichlorométhane
DCO	Demande chimique en oxygène
DGGE	Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant
DMF	N,N-diméthylformamide
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphate
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
FLA	Fluoranthène
FLU	Fluorène
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAP FPM	HAP de faible poids moléculaire
HAP HPM	HAP de haut poids moléculaire
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl β -D-thiogalactoside
KHP	Acide phtalique de potassium
NAP	Naphtalène
ng	nanogramme
nt	Nucléotide
pb	Paire de base
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PER	Pérylène
PHE	Phénanthrène
pmole	Picomole
PYR	Pyrène
SDS	Sodium dodécyl sulfate
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
X-GAL	5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-Galactopyranoside
2VN	2-vinyl-naphtalène

1. INTRODUCTION

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants retrouvés dans l'environnement. Ils sont des constituants naturels des combustibles fossiles et sont générés lors d'une combustion incomplète de la matière organique. Une certaine partie des HAP est générée de façon naturelle lors de feux de forêts ou d'éruptions volcaniques, par contre de nos jours, le charbon et le pétrole représentent les deux sources majeures de HAP. Les HAP constituent une famille de composés organiques formés d'au moins deux cycles benzéniques. Ils sont classés en deux catégories soit les HAP de faible poids moléculaire (HAP FPM) comptant de 2 à 3 cycles benzéniques et les HAP de haut poids moléculaire (HAP HPM) qui comptent plus de 3 cycles benzéniques. En général, les HAP sont plutôt hydrophobes, liposolubles, non-volatils et ont tendance à s'adsorber à la matière organique, ce qui les rend moins disponibles à la biodégradation. Aussi, plus le nombre de cycles aromatiques augmente, moins ces molécules sont solubles. Les HAP HPM sont donc encore plus hydrophobes et récalcitrants à la dégradation microbienne. En plus, certains HAP, principalement des HAP HPM, ont un potentiel mutagène et cancérigène ce qui fait qu'il est important de se pencher sur une méthode de biodégradation efficace des HAP et surtout des HAP HPM.

Il existe différentes méthodes pour traiter les sols contaminés par les HAP. Des méthodes physico-chimiques peuvent être utilisées telles l'incinération, l'adsorption ou l'extraction. Par contre, les méthodes biologiques qui comprennent l'utilisation des microorganismes sont souvent les procédés les plus utilisés pour décontaminer les sols pollués par les HAP. Dans le but de dégrader les HAP HPM, le procédé de biorestauration utilisé doit augmenter leur biodisponibilité puisqu'ils sont très hydrophobes. L'utilisation de systèmes biphasiques représente une technique intéressante pour dégrader les HAP HPM puisque ces systèmes sont constitués d'une phase aqueuse et d'une phase hydrophobe. Dans la phase aqueuse, on retrouve les microorganismes tandis que la phase hydrophobe contient généralement le substrat à dégrader qui se retrouve dissous dans cette phase. Le principe d'un tel système repose sur le fait qu'un composé, tel les HAP, dissous dans un solvant hydrophobe, peut diffuser alors progressivement vers la phase aqueuse. Les bactéries présentes dans la phase aqueuse métabolisent alors le

substrat à un rythme basé sur leur capacité et leur besoin métabolique. La phase hydrophobe agit donc comme un réservoir de substrat.

Plusieurs microorganismes peuvent utiliser les HAP comme source de carbone et d'énergie. Parmi les genres bactériens les plus souvent rencontrés dans la littérature par rapport à la dégradation des HAP, on retrouve *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* et *Flavobacterium*. Certains microorganismes, en culture pure, ont déjà montré leur capacité à dégrader seul des HAP. Par contre la présence d'un consortium bactérien peut être requise pour la dégradation complète de HAP, particulièrement des HAP HPM. Vu la nature complexe et la variété de ces composés, la dégradation effectuée par un consortium est souvent plus efficace.

Le consortium bactérien étudié dans ce projet a été isolé par Marcoux (1998) et provient d'un sol contaminé à l'huile de créosote par les activités d'une usine de traitement du bois. Ce consortium a été enrichi pour la dégradation des HAP HPM en systèmes biphasiques et des travaux d'optimisation ont aussi été effectués (Marcoux, 1998; 2000; Gauthier, 2001). Une caractérisation initiale du consortium bactérien réalisée par Gauthier (2001; 2003) a permis, par isolement sur gélose et séquençage de l'ADNr 16S, d'identifier 4 souches soit *Mycobacterium gilvum* B1, *Bacillus pumilus* B44, *Microbacterium esteraromaticum* B21 et *Porphyrobacter* sp. B51.

Le but de ce projet était donc d'étudier plus en détail la diversité du consortium bactérien capable de dégrader les HAP HPM présents dans un système biphasique. De façon plus spécifique, les objectifs étaient (1) d'étudier la cinétique de dégradation des HAP HPM et en parallèle d'y observer la diversité bactérienne associée par PCR-DGGE, (2) d'identifier et caractériser les bactéries faisant partie du consortium au moyen d'une génothèque d'ADNr 16S et par la culture sur gélose, (3) de déterminer l'effet de l'ajout de HAP FPM sur la cinétique de dégradation des HAP HPM et sur la diversité bactérienne du consortium, (4) de déterminer la présence de certains gènes de dégradation de composés aromatiques et finalement (5) d'étudier la capacité de dégradation des

souches, membres du consortium, isolées sur gélose. Souvent, il est considéré que seulement un très faible pourcentage des bactéries du sol peuvent être cultivés en laboratoire. Ayant comme objectif de faire une meilleure caractérisation du consortium, l'utilisation de la biologie moléculaire telle la création d'une génothèque d'ADNr 16S s'est donc avérée une méthode très importante et judicieuse de façon à identifier une plus grande diversité des bactéries présentes dans le consortium.

2. REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

2.1.1 Structure des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques qui contiennent au moins deux cycles benzéniques. Les noyaux benzéniques sont alors placés dans différents arrangements : linéaire, angulaire ou en amas (Cerniglia, 1992).

Les HAP se distinguent en deux grandes classes soit les HAP de faible poids moléculaire (HAP FPM) et les HAP de haut poids moléculaire (HAP HPM). Les HAP FPM comptent 2 à 3 cycles benzéniques fusionnés tandis que les HAP HPM comptent plus de 3 cycles benzéniques. La figure 2.1 montre des exemples de différents HAP. Il est à noter que les molécules aromatiques contenant un cycle à 5 carbones, comme dans le cas du fluorène (FLU), font aussi partie des HAP.

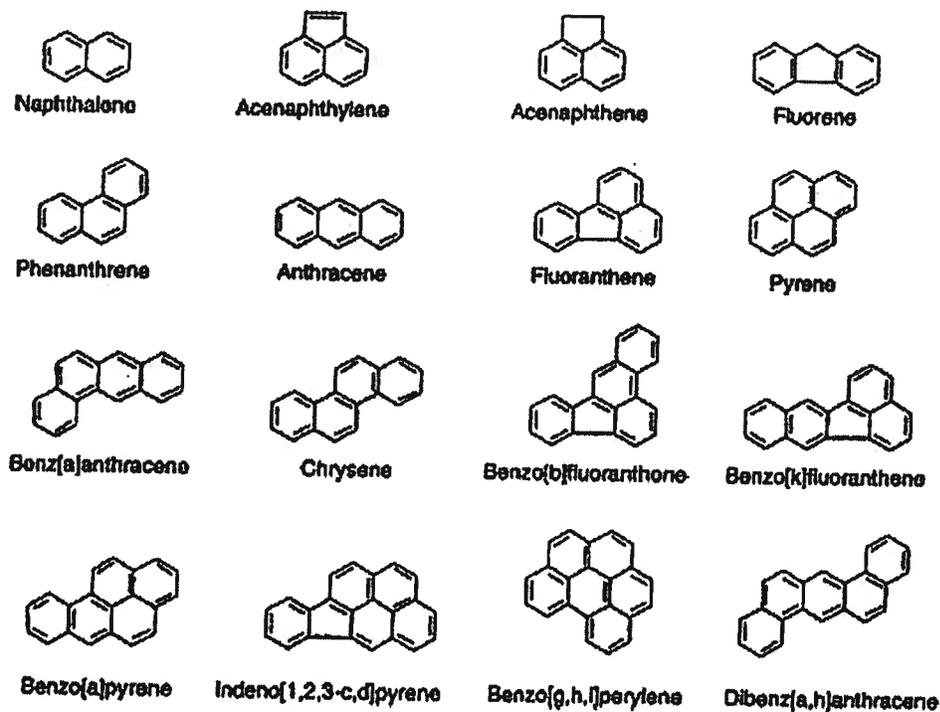


Figure 2.1. Structure moléculaire des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques classés comme polluants prioritaires par le USEPA (Amir *et al.*, 2005).

2.1.2 Réglementation

Selon leur abondance et leur toxicité, 16 HAP sont maintenant classés comme polluants prioritaires par l'agence de protection environnementale américaine (figure 2.1) (U.S. Environmental Protection Agency, USEPA). Sept de ces HAP sont même considérés comme probablement carcinogènes (Integrated Risk Information System (IRIS); <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>). La Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement (LCPE) fournit aussi une liste de substances d'intérêt prioritaire où figurent certains HAP tels le benzo[*a*]pyrène (BAP), le benzo[*b*]fluoranthène, le benzo[*j*]fluoranthène, le benzo[*k*]fluoranthène et l'indéno[1,2,3-*cd*]pyrène qui sont considérés comme pouvant constituer un danger au Canada pour la vie ou la santé humaine (http://www.ec.gc.ca/substances/esc/fre/pesip/lsip1_HAPs.cfm).

2.1.3 Origines et sources des HAP

Les HAP sont ubiquitaires dans l'environnement et proviennent de plusieurs sources. Ils peuvent être retrouvés dans l'air, dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sols et les sédiments. Les HAP sont des constituants naturels des combustibles fossiles et sont générés lors d'une combustion incomplète de la matière organique. Les HAP sont donc souvent reliés à des activités anthropogéniques (Guiysse *et al.*, 2004). Certains HAP sont quand même produits de façon naturelle. En effet, une certaine partie des HAP sont générés naturellement lors de feux de forêts ou de prairies et même lors d'éruption volcanique (Cerniglia, 1992). Le charbon et le pétrole représentent les deux sources majeures de HAP (Harayama, 1997). Le relargage des HAP dans l'environnement se produit dans plusieurs occasions et les origines les plus souvent citées dans la littérature sont la combustion de l'essence et du diesel, la fumée de tabac, les industries pétrochimiques, les accidents de déversements pétroliers et les incinérateurs à déchets (Kanaly et Harayama, 2000; Cerniglia, 1992; Juhasz et Naidu, 2000).

2.1.4 Propriétés physico-chimiques

Les propriétés physico-chimiques des HAP varient surtout selon le nombre de cycles benzéniques qu'ils contiennent et aussi selon l'arrangement de ces cycles (Kanaly et Harayama, 2000). Généralement, lorsque le nombre de cycles benzéniques et l'angularité de la molécule augmentent, on observe une augmentation de l'hydrophobicité et de la stabilité électrochimique du HAP. En fait, la stabilité moléculaire et l'hydrophobicité sont les deux plus importants facteurs qui contribuent à la persistance des HAP, principalement des HAP HPM, dans l'environnement.

Les HAP sont des composés hydrophobes et leur persistance dans les différents écosystèmes est due en très grande partie à leur faible solubilité dans l'eau (Cerniglia, 1992). Le tableau 2.1 permet d'observer à quel point la solubilité dans l'eau diminue lorsque le nombre de cycles benzéniques augmente chez différents HAP. Les HAP ont aussi tendance à s'adsorber à la matière organique des sédiments ce qui leur permet de persister longtemps dans l'environnement jusqu'à temps d'être dégradés, resuspendus, bioaccumulés, etc. (Cerniglia, 1992). En fait, ceci a l'avantage de limiter le déplacement des HAP, mais réduit du même coup considérablement leur biodégradabilité (Guiyesse et Viklund, 2005). Les HAP sont aussi des composés lipophiles, c'est-à-dire qu'ils peuvent s'accumuler dans les graisses. Il peut donc avoir un danger de bioaccumulation tout au long de la chaîne alimentaire. La lipophilie, la persistance dans l'environnement ainsi que la génotoxicité augmentent toutes lorsque le nombre de cycles benzéniques augmente chez les HAP. Il est donc très important de pouvoir dégrader les HAP HPM dans l'environnement.

Tableau 2.1. Solubilité, poids moléculaire et nombre de cycles benzéniques de quelques HAP (adapté de Juhasz et Naidu, 2000; Daugulis et McCracken, 2003; et Cerniglia, 1992).

HAP	Nombre de cycles benzéniques	Poids moléculaire (g/mole)	Solubilité aqueuse à 25°C (mg/L)
Naphtalène	2	128.2	31.700
Phénanthrène	3	178.2	1.300
Pyrène	4	202.3	0.140
Chrysène	4	228.3	0.002
Benzo[a]pyrène	5	252.3	0.003

2.1.5 Toxicité

Plusieurs HAP sont considérés comme potentiellement carcinogènes et sont des contaminants environnementaux auxquels il faut s'intéresser davantage. Différentes études montrent que les HAP FPM sont considérés comme hautement toxiques alors que les HAP HPM sont considérés comme génotoxiques. Le benzo[a]pyrène (BAP) est un des HAP les plus potentiellement carcinogènes et est aussi un des HAP HPM les plus étudiés (Juhasz et Naidu, 2000). Les HAP seraient entre autres impliqués dans les cancers du poumon, de la peau, de la vessie et du côlon. La carcinogénicité des HAP est issue des dommages que ces composés font sur l'ADN. Les HAP en fait doivent être activés en métabolites électrophiles pour exercer leurs effets mutagènes ou carcinogènes. Dans la plupart des cas, le processus d'activation débute par une étape d'oxydation du HAP par les enzymes du cytochrome P450. Les enzymes du cytochrome P450 forment une grande famille d'enzymes impliquées dans le métabolisme et la détoxification des médicaments, des xénobiotiques et des stéroïdes. Ces enzymes ajoutent en premier lieu un groupe époxyde au HAP qui peut être ensuite converti en un groupement dihydrodiol par une époxyde hydrolase avant d'être métabolisé finalement en un groupe diol époxyde (Baird *et al.*, 2005). Cette activation génère donc des espèces électrophiles réactives

biochimiquement qui sont capables d'interagir avec des macromolécules comme les acides nucléiques ou des protéines (Xue et Warshawsky, 2005). En fait, ces composés se lient de façon covalente à l'ADN et forme des dérangements dans l'ADN. Ces changements dans l'ADN peuvent mener à des mutations ou à des lésions promutagènes si elles ne sont pas réparées par la machinerie cellulaire (Goldman *et al.*, 2001).

2.2 Microorganismes dégradant les HAP

Plusieurs microorganismes peuvent dégrader partiellement ou complètement les HAP. Ce sont principalement des bactéries qui participent à cette dégradation, par contre certains champignons et algues ont aussi démontré qu'ils pouvaient dégrader ces composés.

2.2.1 Champignons et algues

Les champignons peuvent transformer les HAP de façon cométabolique en métabolites moins toxiques par l'action de peroxydases et de monooxygénases. Un des champignons les plus étudiés pour ses capacités de dégradation est *Phanerochaete chrysosporium* (Boonchan *et al.*, 2000). Ce basidiomycète de type pourriture blanche a la capacité de dégrader une grande variété de polluants persistants dans l'environnement comme les HAP, les biphényles polychlorés ou les pesticides. Cette capacité de dégradation serait reliée au système d'enzymes ligninolytiques extracellulaires sécrétées dans l'environnement (Kanaly et Hur, 2006). Les champignons dégradant les HAP qui sont les plus fréquemment retrouvés dans la littérature appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Trametes*, *Fusarium*, *Saccharomyces* et *Bjerkandera*.

Quelques recherches ont aussi démontré la dégradation de certains HAP par des algues. En effet, *Selenastrum capricornutum*, une algue verte, peut dégrader le fluoranthène (FLA), le pyrène (PYR) (Lei *et al.*, 2007) et le benzo[*a*]pyrène (Lei *et al.*,

2007; Cerniglia, 1992; Juhasz et Naidu, 2000; Warshawsky *et al.*, 1995). La dégradation du BAP par cette algue a mené à la formation de dihydrodiols par la voie enzymatique d'une dioxygénase (Juhasz et Naidu, 2000). D'autres espèces comme *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus* et *Scenedesmus quadricauda* ont aussi montré une certaine capacité de dégradation des HAP (Lei *et al.*, 2007).

2.2.2 Bactéries

2.2.2.1 Anaérobie

Il est reconnu que les HAP sont souvent dégradés en aérobie. Par contre, la biodégradation des HAP a aussi été rapportée sous différentes conditions anaérobies : conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes (Chang *et al.*, 2005). En fait, le naphtalène (NAP) (Rockne *et al.*, 2000), le phénanthrène (PHE), le PYR et l'anthracène (ANT) ont été complètement oxydés en CO₂ sous conditions dénitrifiantes (McNally *et al.*, 1998). De plus, la dégradation du NAP et du PHE a été obtenue sous conditions sulfato-réductrices (Coates *et al.*, 1996; Meckenstock *et al.*, 2000). Chang *et al.* (2006) ont aussi démontré que, dans les cultures étudiées, la dégradation du naphtalène et du phénanthrène était couplée à la méthanogénèse.

2.2.2.2 Aérobie

Plusieurs bactéries, appartenant à différents genres, peuvent utiliser les HAP comme source de carbone et d'énergie. Les genres bactériens les plus souvent rencontrés dans la littérature sont *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* et *Flavobacterium* (Juhasz et Naidu, 2000; Cerniglia, 1992). Les bactéries sont capables de minéraliser certains HAP, de les dégrader en produits moins toxiques ou de les dégrader par cométabolisme. La minéralisation consiste en la dégradation complète du composé en CO₂ et en H₂O. Le cométabolisme quant à lui est un phénomène par lequel un composé est dégradé de façon fortuite sans servir de source de carbone et d'énergie pour le microorganisme. Plusieurs études ont démontré la capacité de nombreux

microorganismes à dégrader les HAP FPM et les HAP HPM. Quelques-unes de ces études sont résumées dans les prochains paragraphes.

En 1988, Heitkamp et Cerniglia ont réussi à isoler de l'environnement une souche bactérienne qui pouvait dégrader les HAP comprenant 4 cycles benzéniques. La souche dégradait de façon cométabolique plusieurs HAP HPM dont le FLA, le PYR et le BAP lorsqu'elle était cultivée pendant 2 semaines avec des nutriments organiques. La même année, Mahaffey *et al.* (1988) ont démontré que la souche *Beijerinckia* sp. B1 (reclassifié *Sphingomonas yanoikuyae* B1) pouvait oxyder le benz[*a*]anthracène (BAA) suite à une induction avec du biphényle, du *m*-xylène et du salicylate. *Beijerinckia* sp. B1 pouvait utiliser le biphényle, le NAP, le PHE et l'anthracène comme seules sources de carbone et d'énergie (Gibson, 1999).

En 1989, Mueller *et al.* ont été les premiers à démontrer que la dégradation bactérienne d'un HAP HPM comme seule source de carbone et d'énergie était possible. En fait, ils ont isolé un consortium bactérien d'un sol contaminé à la créosote. Ce consortium, comprenant sept bactéries, était capable d'utiliser le FLA. De ce consortium, la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 a été isolée (Mueller *et al.*, 1990). Cette souche pouvait utiliser le FLA comme seule source de carbone et d'énergie. Une culture en phase stationnaire de *S. paucimobilis* EPA505, cultivée en présence de FLA, a démontré une capacité à cométaboliser le BAP, le benzo[*b*]fluoranthène, le BAA, le chrysène (CHY) et le PYR (Ye *et al.*, 1996).

Une souche de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 a aussi été isolée d'un sol contaminé par l'huile grâce à sa capacité à dégrader le PYR. Plus de 60% de pyrène radio-marqué a été minéralisé après 96 heures d'incubation. Cette bactérie a aussi démontré la capacité de minéraliser d'autres HAP tels le NAP, le PHE, le FLA, le 3-méthylcholanthrène, 1-nitropyrène et le 6-nitrochrysène (Heitkamp et Cerniglia, 1988, 1989; Khan *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006). D'autres bactéries du genre *Mycobacterium* et pouvant minéraliser le PYR ont aussi été isolées. Par exemple, Grosser *et al.* (1991) ont isolé la souche *Mycobacterium* sp. RJGII-135. L'identification de métabolites

intermédiaires de la dégradation du PYR a permis de confirmer les voies de dégradation de ce composé déjà proposées (Kanaly et Harayama, 2000). En effet, la minéralisation du PYR a augmenté lorsque cette souche était réintroduite dans le sol. D'ailleurs, d'autres études de dégradation ont été effectuées sur cette souche et Schneider *et al.* (1996) ont identifié des produits de dégradation du BAP et ont pu proposer les voies de dégradation du BAP par cette souche lorsqu'elle poussait en présence d'extrait de levures, de peptone et d'amidon soluble. La même année, Dean-Ross et Cerniglia (1996) ont isolé une souche de *Mycobacterium flavescens* à partir de sédiments pollués. Cette souche est capable de minéraliser le PYR à un taux de $0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ par jour. *M. flavescens* peut aussi minéraliser le PHE et le FLA, mais ne peut pas minéraliser le NAP, le CHY, l'ANT, le FLU et le BAP.

Weissenfels *et al.* (1990) ont rapporté l'isolement de *Alcaligenes denitrificans* WW1 qui peut dégrader le FLA à un taux de 0.3 mg/mL par jour et cométaboliser d'autres HAP tels le PYR et le BAA (Weissenfels *et al.*, 1990, 1991). L'identification des métabolites de dégradation a permis aux auteurs de proposer une voie de dégradation du FLA (Weissenfels *et al.*, 1991). En 1991, Walter *et al.* ont isolé la souche *Rhodococcus* sp. UW1 d'un sol contaminé qui est capable d'utiliser le PYR et le CHY comme seules sources de carbone et de cométaboliser le BAP en présence de PYR (Juhasz et Naidu, 2000). Une autre souche capable de minéraliser le CHY a aussi été isolée par Willison (2004). En effet, *Sphingomonas* sp. CHY-1 a pu dégrader 97.5% de CHY après 35 jours. Cette souche peut aussi croître sur des substrats comme le NAP, le PHE et l'ANT.

En 1997, Dagher *et al.* ont comparé cinq souches isolées de sols contaminés et dégradant les HAP. Les souches étudiées étaient *Pseudomonas putida* 34, *Pseudomonas fluorescens* 62, *Pseudomonas aeruginosa* 57, *Sphingomonas* sp. 107 et la souche PL1. Les cinq souches dégradent le NAP, le dibenzothiophène, le FLU, le PHE et l'ANT. De plus, la souche PL1 et *Sphingomonas* sp. 107 montraient des capacités de dégradation pour le FLA, le BAA et le PYR. Plus récemment, Zhang *et al.* (2004) ont isolé trois souches d'un sol contaminé par les HAP. Les trois souches sont *Pseudomonas* sp. Wphe1, *Microbacterium* Sphe1 et *Paracoccus* Ophe1. *Pseudomonas* sp. Wphe1 peut dégrader le

NAP et le PHE, *Microbacterium* sp. Sphe1 dégrade le PHE tandis que la souche *Paracoccus* sp. Ophe1 peut dégrader l'ANT, le PHE, le FLU, le FLA, le CHY et le PYR.

2.2.2.3 Consortium

Plusieurs microorganismes sont capables de minéraliser des HAP. Par contre la présence d'un consortium bactérien peut être requis pour la dégradation complète de HAP, particulièrement des HAP HPM. Vu la nature complexe et la variété de ces composés, la dégradation effectuée par un consortium est souvent plus efficace (Vinas *et al.*, 2005b). En effet, lorsqu'il y a plusieurs bactéries impliquées, chaque microorganisme peut fournir les enzymes impliquées dans une certaine étape de la dégradation. Les métabolites intermédiaires de la dégradation des composés peuvent alors être utilisés comme source de carbone par les autres bactéries ou servir d'inducteurs de la dégradation pour d'autres bactéries (Marcoux, 1998). De plus, certains métabolites intermédiaires peuvent être toxiques pour quelques bactéries tandis que d'autres peuvent les utiliser comme source de carbone. Plusieurs études ont d'ailleurs montré la dégradation des HAP par différents consortiums bactériens (Mueller *et al.*, 1989; Vinas *et al.*, 2005b.; Yu *et al.*, 2005b; Bouchez *et al.*, 1999).

2.3 Voies de dégradation des HAP et gènes impliqués

2.3.1 Voie de dégradation chez les champignons

Chez les champignons, l'attaque initiale du cycle aromatique se fait de façon différente si l'on compare aux bactéries. Chez les champignons non-ligninolytiques, ils ont la capacité d'oxyder les HAP. Par exemple, chez *Cunninghamella elegans*, on retrouve une enzyme de type cytochrome P-450 monooxygénase qui est utilisée pour incorporer un atome d'oxygène dans le cycle aromatique (voir figure 2.2). Cette

oxydation mène à la formation d'un oxyde d'arène. Ce composé peut être par la suite transformé par une époxyde hydrolase pour générer un *trans*-dihydrodiol. L'oxyde d'arène peut aussi être réarrangé de façon non enzymatique et former du phénol (Cerniglia, 1992). D'autres recherches se sont portées sur les champignons de la pourriture blanche qui ont eux aussi démontré une capacité à dégrader les HAP. Ces champignons produisent plutôt des enzymes extracellulaires comme la lignine peroxydase qui, en plus de dégrader les composés ligneux, peut catalyser l'oxydation des HAP en quinones (Cerniglia, 1992).

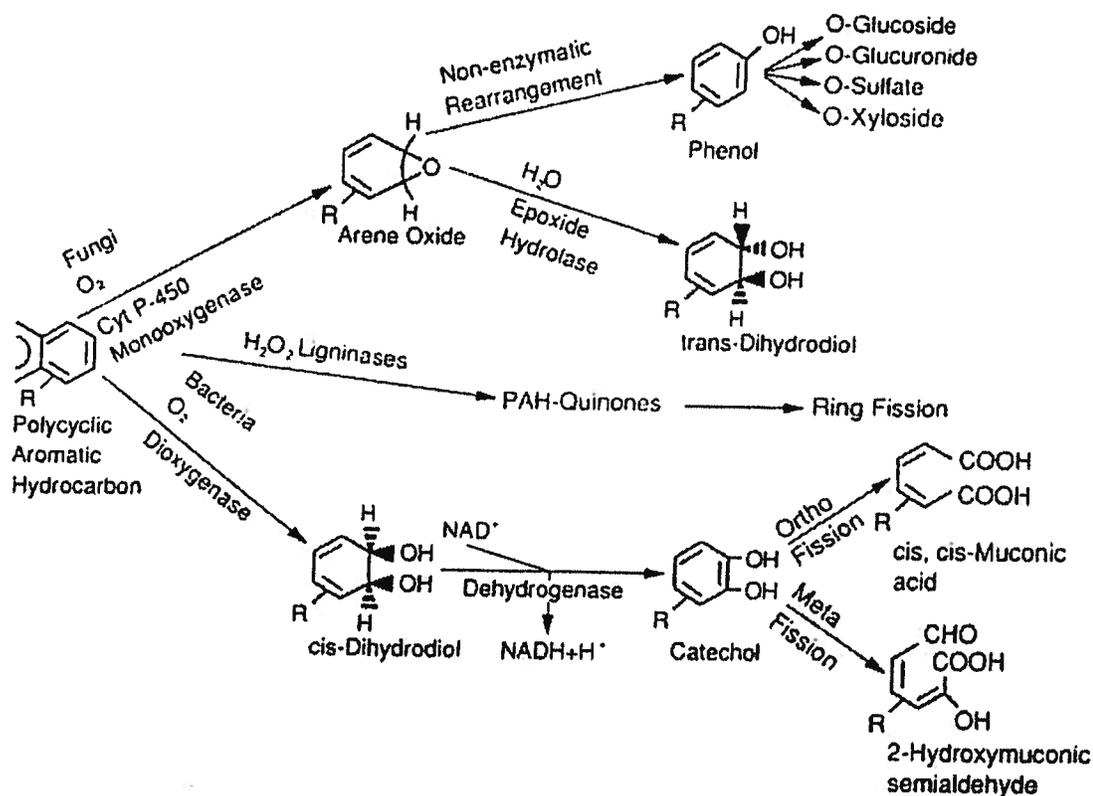


Figure 2.2. Voie de dégradation des HAP chez les champignons et les bactéries (Cerniglia, 1992).

2.3.2 Voie de dégradation bactérienne

Les voies de dégradation bactérienne des HAP ont beaucoup été étudiées, principalement pour les HAP FPM. Généralement, la biodégradation aérobie de composés aromatiques débute par l'incorporation d'oxygène au cycle aromatique via l'action d'une enzyme de type dioxygénase. Cet ajout d'oxygène mène à la formation de *cis*-dihydrodiols. L'action d'une *cis*-diol déshydrogénase provoque par la suite l'apparition d'intermédiaires dihydroxylés. Ces composés dihydroxylés, tel le catéchol, peuvent ensuite être clivés en position *ortho* ou *meta* par une autre dioxygénase qui permet finalement d'obtenir des intermédiaires qui pourront être incorporés dans le cycle des acides tricarboxyliques (Habe et Omori, 2003; Juhasz et Naidu, 2000). Le clivage de ces cycles aromatiques mène donc à la production par exemple d'acide pyruvique, d'acide succinique ou d'acétaldéhyde qui sont utilisés par les microorganismes dans la synthèse des constituants cellulaires ou comme source d'énergie (Wilson et Jones, 1993). Ces réactions de dégradation, lorsqu'elles sont complètes, génèrent une production d'eau et de CO₂ et représentent donc une minéralisation complète des HAP (Juhasz et Naidu, 2000).

2.3.2.1 Voie de dégradation du NAP

La voie catabolique de dégradation du NAP est certainement une des plus étudiée au niveau des HAP. En fait, c'est depuis 1964 (Davies et Evans, 1964) qu'on s'intéresse à ce sujet. La dégradation du NAP débute par l'introduction de deux atomes d'oxygène dans un cycle aromatique via l'action de la naphtalène dioxygénase. Cette enzyme catalyse l'oxydation du NAP en *cis*-naphtalène dihydrodiol. Les réactions enzymatiques subséquentes qui mettent en jeu entre autres des enzymes comme la *cis*-naphtalène dihydrodiol déshydrogénase, la 1-2-dihydroxynaphtalène dioxygénase ou la salicylaldehyde déshydrogénase mènent à la formation de salicylate et éventuellement à des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques (Goyal et Zylstra, 1996; Habe et Omori, 2003) (voir figure 2.3).

2.3.2.2 Voie de dégradation des HAP HPM

À ce jour, les voies de dégradation des HAP HPM sont encore plus ou moins élucidées totalement. De plus en plus, l'identification de métabolites intermédiaires de dégradation permet la proposition de certaines voies de dégradation. Cerniglia avait proposé en 1992, une voie de dégradation bactérienne du pyrène. Par la suite, la présence de certains métabolites intermédiaires de cette voie a aussi été confirmée suite à l'identification de métabolites de dégradation du PYR par *Mycobacterium flavescens* (Dean-Ross et Cerniglia, 1996) et *Mycobacterium* sp. KR2 (Rehmann *et al.*, 1998). Heitkamp et Cerniglia (1988) ont aussi identifié et confirmé quelques intermédiaires de la dégradation du PYR lors de leurs recherches chez *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. De plus, Walter *et al.* (1991) ont étudié la dégradation du pyrène chez la souche *Rhodococcus* sp. UW1 et ont identifié un métabolite de dégradation. Les différentes voies de dégradation du PYR ont été résumées par Kanaly et Harayama (2000) et sont illustrées à la figure 2.4. Quant au chrysène, plusieurs souches bactériennes pouvant dégrader cet HAP ont été isolées, mais aucune étude biochimique de la dégradation bactérienne du CHY n'a été effectuée (Willison, 2004). Par contre, une étude sur une souche mutante de *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (B8/36) a montré que cette souche pouvait hydroxyler le CHY pour générer du chrysène *cis*-3,4-dihydrodiol ce qui pourrait donc être le premier intermédiaire de la dégradation du CHY (Boyd *et al.*, 1997). Des recherches ultérieures ont permis d'isoler et d'identifier le 3,4,9,10-tétrahydroxy-3,4,9,10-tétrahydrochrysène, le premier *bis-cis* diol à être identifié (Boyd *et al.*, 1999; Gibson, 1999). Bien qu'aucune bactérie rapportée ne peut utiliser le BAP comme seule source de carbone et d'énergie, plusieurs métabolites de la dégradation du BAP ont été identifiés (Kanaly et Harayama, 2000). Les bactéries dégradant le BAP poussaient donc en présence d'une autre source de carbone (voir la section 2.2.2.2 pour quelques exemples de ces bactéries dégradant le BAP). Une voie de dégradation du BAP a été proposée (voir figure 2.5) chez la souche *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Schneider *et al.*, 1996). Bien que Schneider *et al.* (1996) n'aient pas pu isoler le *cis*-4,5-BAP-dihydrodiol et le *cis*-9,10-BAP-dihydrodiol, ces deux intermédiaires ont été proposés suite à l'identification de l'acide 4,5-chrysène-dicarboxylique et de l'acide *cis*-4-(8-hydroxypyren-7-yl)-2-oxobut-3-énoïque.

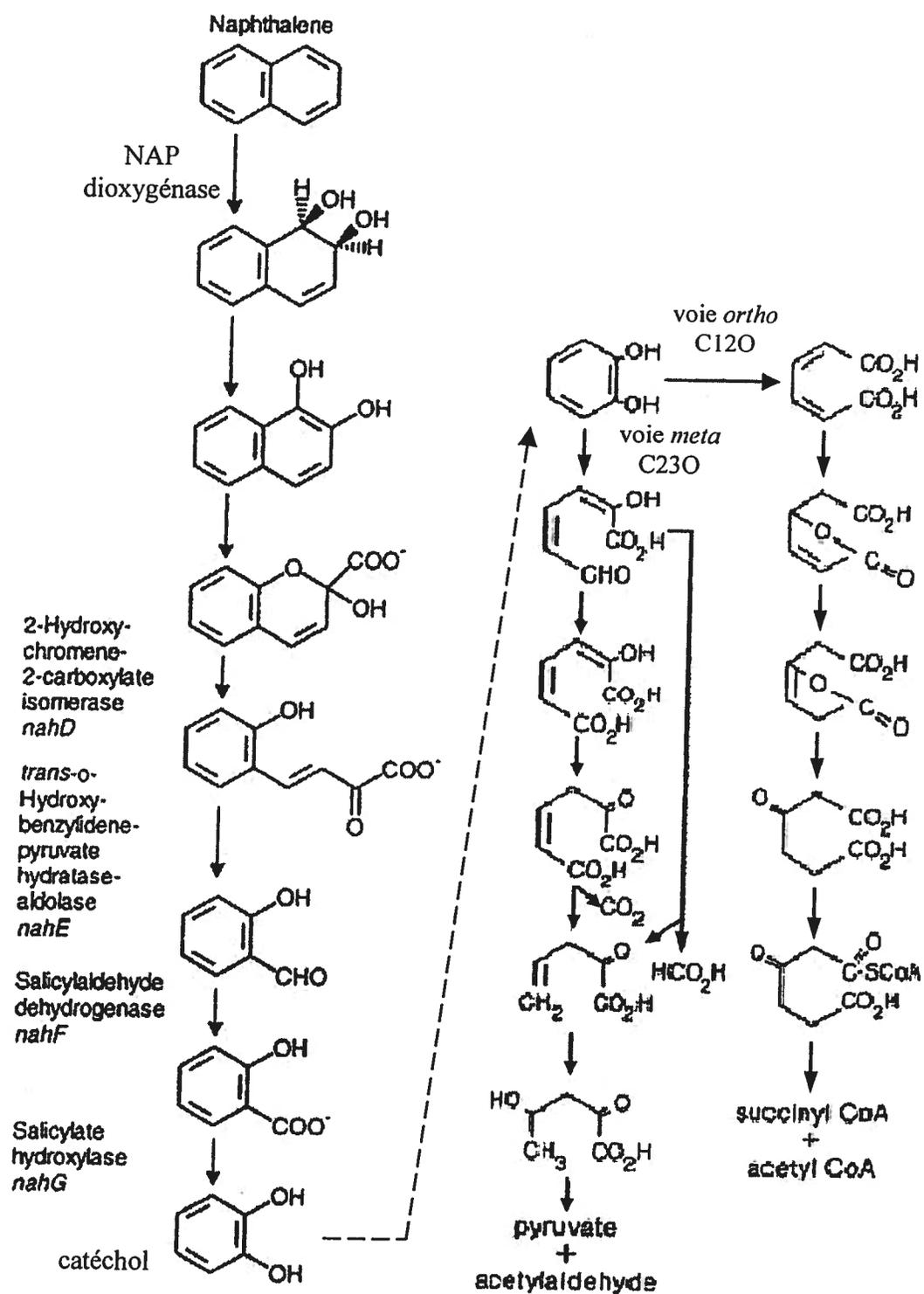


Figure 2.3. Voie de dégradation du NAP. C12O : catéchol 1,2-dioxygénase; C23O : catéchol 2,3-dioxygénase (Adapté de Kim et Zylstra, 1999; Yen et Gunsalus, 1985).

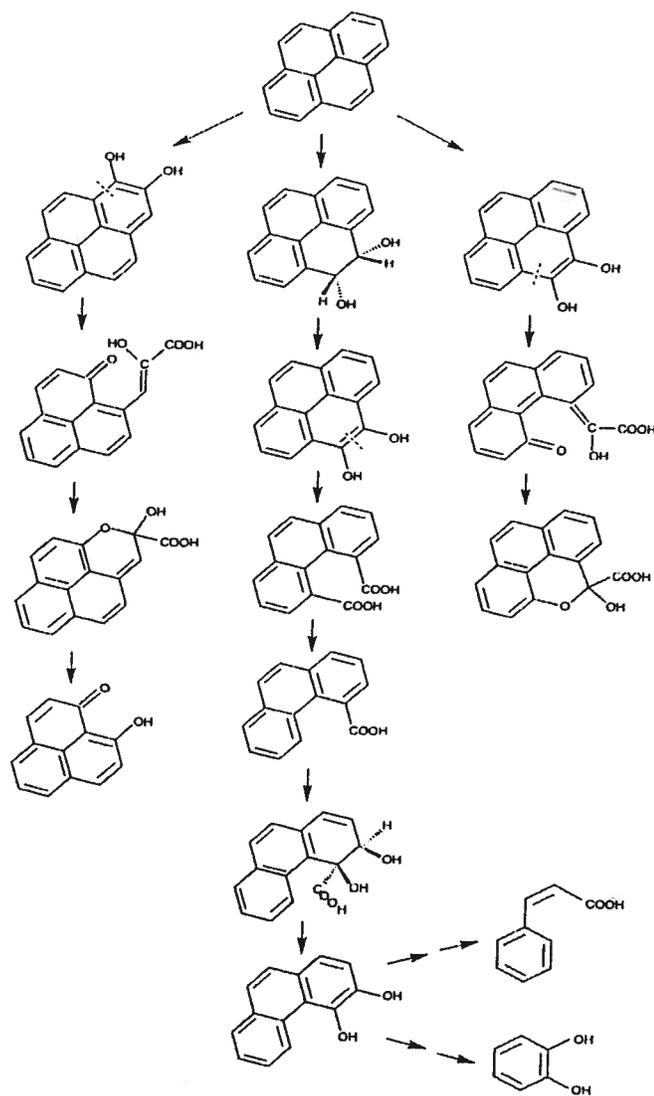


Figure 2.4. Voies de dégradation du PYR chez les bactéries (Cerniglia, 1992; Walter *et al.*, 1991; Heitkamp et Cerniglia, 1988; Kanaly et Harayama, 2000).

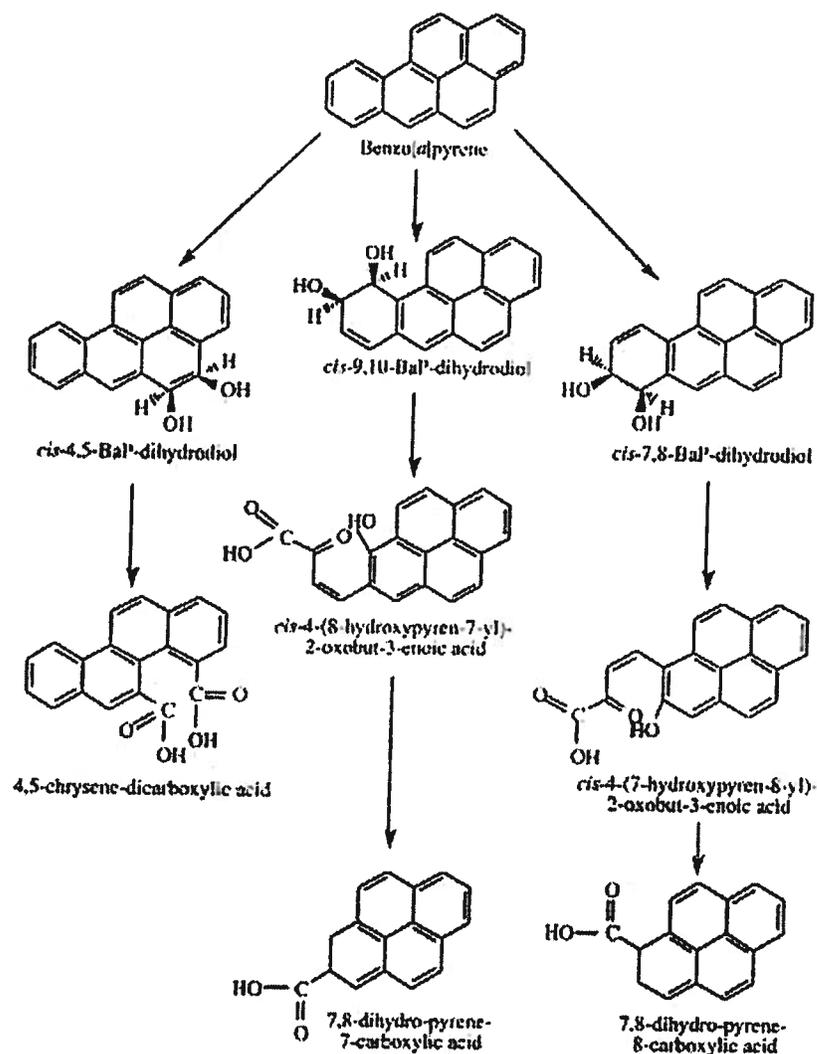


Figure 2.5. Voie de dégradation du BAP chez *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Schneider *et al.*, 1996; Juhasz et Naidu, 2000). Les flèches situées entre les différents métabolites ne représentent pas nécessairement une seule réaction.

2.3.3 Gènes et enzymes impliqués dans la dégradation des composés aromatiques

Les enzymes de types monooxygénase et dioxygénase sont souvent des enzymes clés impliquées dans la biodégradation de composés aromatiques. Plusieurs des gènes codant pour ces enzymes ont été retrouvés et caractérisés chez différentes espèces bactériennes impliquées dans les processus de biodégradation (Luz *et al.*, 2004).

La génétique entourant la dégradation du naphthalène a été beaucoup étudiée chez la souche *Pseudomonas putida* G7. En effet, Dunn et Gunsalus ont isolé en 1973 le plasmide transmissible NAH7 (voir figure 2.6) codant pour le catabolisme du naphthalène chez cette bactérie (Habe et Omori, 2003). Les gènes cataboliques sont organisés en opérons sur ce plasmide de 83 kb. L'opéron *nah* (gènes *nahA-nahF,nahQ*) code pour des enzymes impliquées dans la dégradation du NAP en salicylate. L'opéron *sal* (gènes *nahG-nahO,nahT*) contient les gènes pour les enzymes permettant la transformation du salicylate en catéchol puis en intermédiaires du cycle de Krebs (Grimm et Harwood, 1999). Ces deux opérons sont régulés par une protéine codée par le gène *nahR* retrouvé aussi sur le plasmide et localisé entre les deux opérons (voir figures 2.6 et 2.7). La protéine NahR est d'ailleurs requise pour avoir une haute expression des gènes *nah* ainsi que leur induction par le salicylate (Habe et Omori, 2003).

De façon générale, la première enzyme impliquée dans la dégradation du naphthalène est la NAP dioxygénase. La figure 2.8 montre d'ailleurs l'oxydation initiale du NAP par cette enzyme. Cette protéine convertit le NAP en *cis*-naphthalène dihydrodiol. La NAP dioxygénase est une protéine multimérique comprenant une réductase (*nahAa*), une ferrédoxine (*nahAb*) et deux sous-unités possédant des centres fer-soufre : la grande sous-unité α (*nahAc*) et la petite sous-unité β (*nahAd*) (Habe et Omori, 2003). Le domaine catalytique de la NAP dioxygénase est essentiel pour son activité. La structure de cette enzyme a montré que l'indole peut aussi se lier au centre catalytique. La NAP dioxygénase catalyse donc aussi la transformation de l'indole en indigo ce qui amène une coloration bleu foncé aux bactéries impliquées. C'est en 1983 que Ensley *et al.* ont rapporté cette méthode de détection. Le test de l'indole permet en effet de détecter

facilement si les bactéries étudiées possèdent la NAP dioxygénase ou une enzyme similaire pouvant accueillir l'indole dans son centre catalytique.

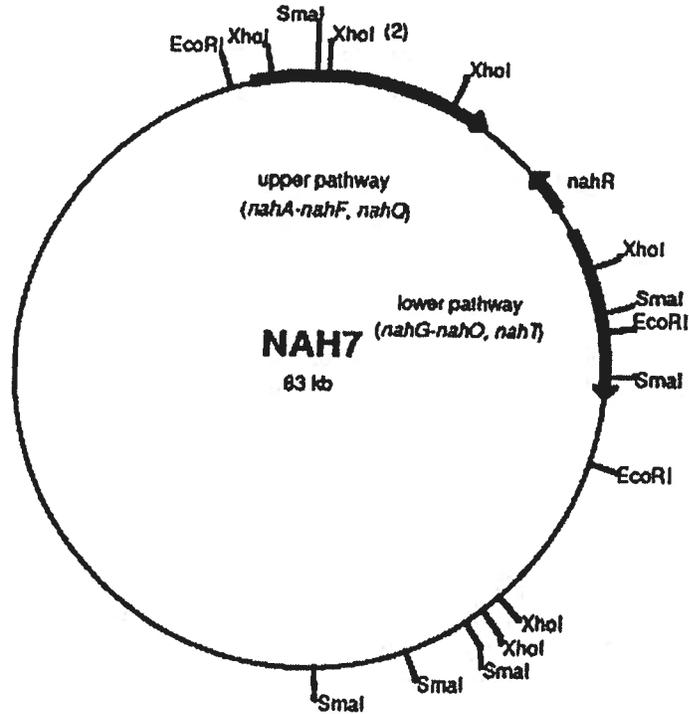


Figure 2.6. Plasmide NAH7 impliqué dans la dégradation du NAP chez *Pseudomonas putida* G7 (Grimm et Harwood, 1999).

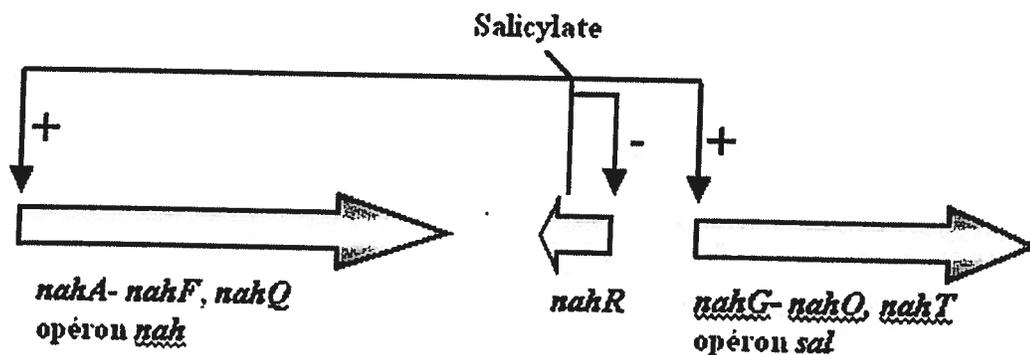


Figure 2.7. Arrangement transcriptionnel des gènes *nah*, régulation des deux opérons par le gène *nahR* et induction possible par le salicylate (Chaudhry, 1994).

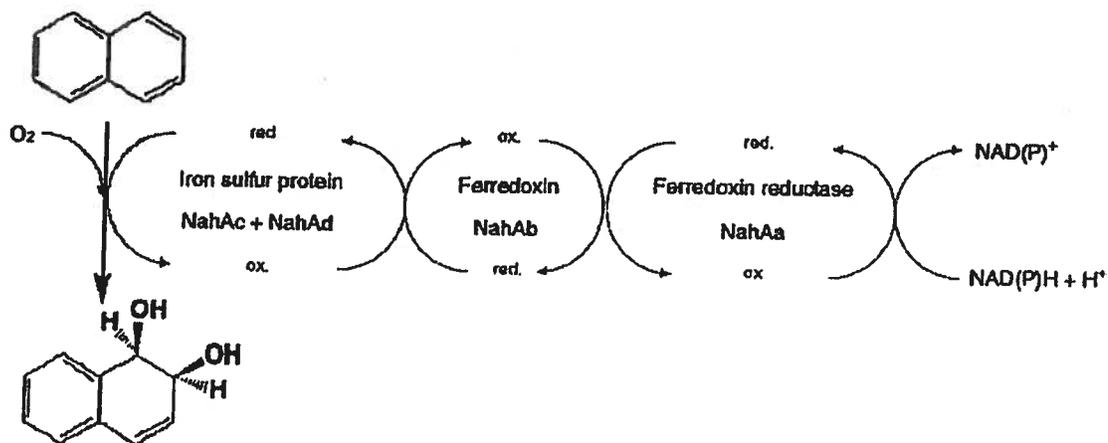


Figure 2.8. Oxydation initiale du naphthalène par la NAP dioxygénase (Habe et Omori, 2003).

Chez plusieurs genres bactériens (*Pseudomonas*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas*, *Rhodococcus*), des gènes ressemblant aux gènes *nah* ont été observés. Ils sont d'ailleurs regroupés comme étant les gènes « *nah* apparentés». Ces gènes qu'on retrouve sous différents noms (*nah*, *ndo*, *pah*, *dox*) forment un groupe de gènes très conservés puisqu'on y retrouve une homologie d'environ 90% en acides aminés. Le centre catalytique de ces dioxygénases semble particulièrement bien conservé. D'autres gènes codant pour des dioxygénases, plus éloignés phylogénétiquement, ont aussi été caractérisés tels *nag* (*Ralstonia* sp.), *nar* (*Rhodococcus* sp. NCBIB12038), *phd* (*Comamomas testosteroni* GZ39; *Nocardioides* sp. KP7), *phn* (*Burkholderia*, sp. RP007; *Alcaligenes faecalis* AFK2). Ces gènes sont tous impliqués aussi dans la dégradation du NAP ou du PHE (Tuomi *et al.*, 2004; Habe et Omori, 2003; Goyal et Zylstra 1997; Saito *et al.*, 1999).

La dégradation aérobie des HAP mène souvent à la formation d'un intermédiaire qui est le catéchol. Le clivage en position *meta* du catéchol est catalysé par une enzyme qui est la catéchol 2,3-dioxygénase. Cette étape semble être l'étape subséquente la plus commune lors de la dégradation des HAP dans la voie inférieure. Des gènes codant pour des catéchol 2,3-dioxygénases ont été trouvés chez différents genres bactériens comme

Pseudomonas, *Sphingomonas*, *Ralstonia*, *Bacillus* et *Rhodococcus* (Meyer *et al.*, 1999). En 1997, plus d'une vingtaine de gènes codant pour des dioxygénases clivant en position *meta* avaient été séquencés ce qui a montré qu'il existe une diversité considérable dans cette catégorie de gènes (Daly *et al.*, 1997). Trois de ces gènes les mieux caractérisés sont *xylE*, *nahC* et *bphC*. Le gène *xylE* code pour une catéchol 2,3-dioxygénase impliquée dans le métabolisme du xylène et possède une homologie importante avec le gène *nahH* qui code pour une catéchol 2,3-dioxygénase impliquée dans le métabolisme du naphthalène. Le gène *nahC* code pour une 1,2-dihydroxynaphthalène dioxygénase tandis que le gène *bphC* code pour une 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase.

Le pyrène est souvent utilisé comme HAP modèle des HAP HPM. Heitkamp et Cerniglia ont rapporté pour la première fois en 1988 une souche bactérienne capable de minéraliser le pyrène. Depuis, plusieurs espèces bactériennes dégradant le pyrène ont été rapportées. En 2001, les gènes codant pour une nouvelle dioxygénase impliquée dans la dégradation des HAP ont été clonés et séquencés chez la souche *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. Une approche protéomique a permis d'identifier certaines protéines impliquées dans la dégradation des HAP chez cette souche lorsqu'elle était en présence de PYR, de PHE ou de dibenzothiophène. Des étapes de clonage et séquençage ont permis de trouver les gènes codant pour une déshydrogénase (*nidD*), la petite sous-unité « β » d'une dioxygénase (*nidB*), la grande sous-unité « α » de la dioxygénase (*nidA*) (Khan *et al.*, 2001; Habe et Omori, 2003). Les gènes *nid* codant pour des dioxygénases ont aussi été retrouvés chez *M. gilvum*, *M. frederiksbergense* et *M. flavescens*. Les dioxygénases « *nid* » sont particulièrement retrouvées chez les mycobactéries et se retrouvent plutôt éloignées phylogénétiquement des dioxygénases trouvées chez les bactéries du genre *Pseudomonas* (Hall *et al.*, 2005).

2.3.4 Inducteurs de la dégradation des HAP

Dans la littérature, certains inducteurs de la dégradation des HAP peuvent être retrouvés. Le salicylate est un intermédiaire de la dégradation du NAP et est aussi un inducteur de la dégradation du NAP (Yen et Serdar, 1988). En effet, le salicylate peut

induire le gène *nahR* qui lui, régule les deux opérons (*nah* et *sal*) impliqués dans le métabolisme du NAP (voir section 2.3.3.). Il a aussi été montré que le salicylate pouvait agir comme inducteur de la dégradation du PHE et d'autres HAP tels que le FLA, PYR, BAA, CHY et BAP (Chen et Aitken, 1999; Dagher *et al.*, 1997). De plus, le biphényle, le m-xylène et le salicylate ont aussi été utilisés comme inducteurs de la dégradation du BAA chez *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (Mahaffey *et al.*, 1988). Certains HAP FPM ont aussi montré une capacité à induire ou stimuler la dégradation de HAP HPM. Marcoux (1998) a observé que, dans l'ensemble, l'ajout de NAP ou de PHE avait eu un effet stimulateur sur la cinétique de biodégradation des quatre HAP étudiés soit le PYR, le CHY, le BAP et le pérylène (PER). Il a aussi été montré qu'une culture bactérienne de *Pseudomonas saccharophila* P15 induite avec du PHE avait minéralisé le PHE, le BAA, le CHY et le BAP à un taux beaucoup plus important que dans les cultures non-induites (Chen et Aitken, 1999).

2.4 Traitement des sols contaminés par les HAP

Les sols contaminés par des polluants organiques requièrent souvent un traitement puisqu'ils représentent un risque de pollution de la nappe aquifère par migration des composés en plus de l'effet direct possible sur l'écosystème indigène. Si un sol contaminé doit être traité, deux choix sont possibles : traiter le sol en utilisant des méthodes *in situ* ou *ex situ*. Les méthodes *ex situ* consistent à enlever le sol contaminé de son emplacement pour le traiter et le retourner à la même place, tandis que les méthodes *in situ* ont lieu sur le site contaminé et ne requièrent pas d'excavation du sol (Daugulis, 2001). Les méthodes *in situ*, bien que relativement peu coûteuses, montrent certaines limites. Le taux de dégradation est souvent moins rapide dû aux conditions environnementales, il faut aussi se soucier du fait que le contaminant ait pu être entraîné vers un autre site avant la dégradation complète (Daugulis, 2001). En général, on considère qu'il y a deux grands types de traitements possibles soit les traitements non-biologiques et biologiques.

2.4.1 Traitements non-biologiques

Les traitements non-biologiques sont souvent des traitements de type physico-chimique. Il peut s'agir par exemple d'incinération qui consiste à chauffer le sol contaminé à une très haute température dans un four à combustion, d'adsorption à des particules de charbon activé ou d'extraction des hydrocarbures par des solvants ou détergents. Des réactions chimiques oxydatives sont aussi possibles pour traiter les HAP. Le désavantage de ces méthodes est qu'elles ne permettent souvent qu'à extraire, adsorber ou concentrer les polluants sans les dégrader ou les rendre moins dangereux (Morgan et Watkinson, 1989).

2.4.2 Traitements biologiques

L'utilisation des microorganismes est un des procédés les plus utilisés pour décontaminer les sols pollués par les HAP (Yu *et al.*, 2005a). Les traitements biologiques peuvent être effectués *in situ* ou *ex situ*. Par exemple, les biopiles et les bioréacteurs de boue activée sont des méthodes biologiques *ex situ* de traitement d'un sol contaminé. Pour augmenter l'efficacité de dégradation, différentes stratégies de biorémédiation peuvent être choisies. La bioaugmentation consiste à introduire dans le milieu contaminé une population de microorganismes exogènes capable de dégrader ces polluants (Watanabe, 2001). Il y a aussi la biostimulation qui consiste plutôt à stimuler la population microbienne déjà présente dans le milieu à décontaminer en ajoutant les nutriments et des composés pouvant leur servir d'accepteurs d'électrons. Avant de procéder à la biostimulation, il est important de confirmer qu'il y a bel et bien présence, dans cet environnement, de microorganismes capables de dégrader les HAP (Habe et Omori, 2003).

2.5 Systèmes biphasiques

Les systèmes biphasiques, aussi appelés bioréacteurs à biphasse aqueuse/organique, ont tout d'abord été utilisés lors de fermentations extractives. En effet, lors de ces fermentations, la phase organique, non miscible, permettait d'enlever de façon sélective et *in situ* les produits inhibiteurs générés provenant de la phase aqueuse. Par exemple, ce système a été entre autres utilisé lors de la fermentation lactique en partitionnant l'acide lactique dans la phase organique à mesure qu'il était produit et ainsi éloigner ce produit des bactéries (Daugulis, 1997).

En partant de ce concept, les recherches se sont poursuivies du côté des biotechnologies environnementales. Pour ce qui est du traitement biologique de composés xénobiotiques, un des points très important est la disponibilité du substrat pour les microorganismes. En fait, une trop grande concentration de substrats peut inhiber ou tuer les microorganismes tandis qu'une trop faible concentration peut mener à une carence ou à des performances sous-optimales (Daugulis, 2001). Les systèmes biphasiques ont donc aussi été utilisés pour dégrader les xénobiotiques. Cette fois, la phase organique était utilisée comme un réservoir de substrats toxiques ou très peu solubles pouvant être relargués et dégradés dans la phase aqueuse. Les systèmes biphasiques ont été utilisés, avec succès, pour dégrader plusieurs composés tels le phénol, le trichlorophénol, les BTX (benzène, toluène et xylène), le styrène, et différents HAP (Collins et Daugulis, 1997, 1999; Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995a; El Aalam *et al.*, 1993; Marcoux, 1998, 2000).

2.5.1 Caractéristiques d'un système biphasique

Les systèmes biphasiques sont constitués d'une phase aqueuse et d'une phase hydrophobe. Dans la phase aqueuse, on retrouve les microorganismes tandis que la phase hydrophobe contient généralement le substrat à dégrader qui se retrouve dissous dans cette phase (voir figure 2.9). Dans un système biphasique, il existe différentes façons pour les bactéries d'entrer en contact avec les substrats qui doivent être dégradés. Aussi, plusieurs caractéristiques sont à considérer pour un système biphasique. Le choix du solvant constituant la phase hydrophobe est aussi une étape importante. De plus, on doit

prendre en compte le taux de transfert du polluant et choisir les microorganismes qui seront utilisés.

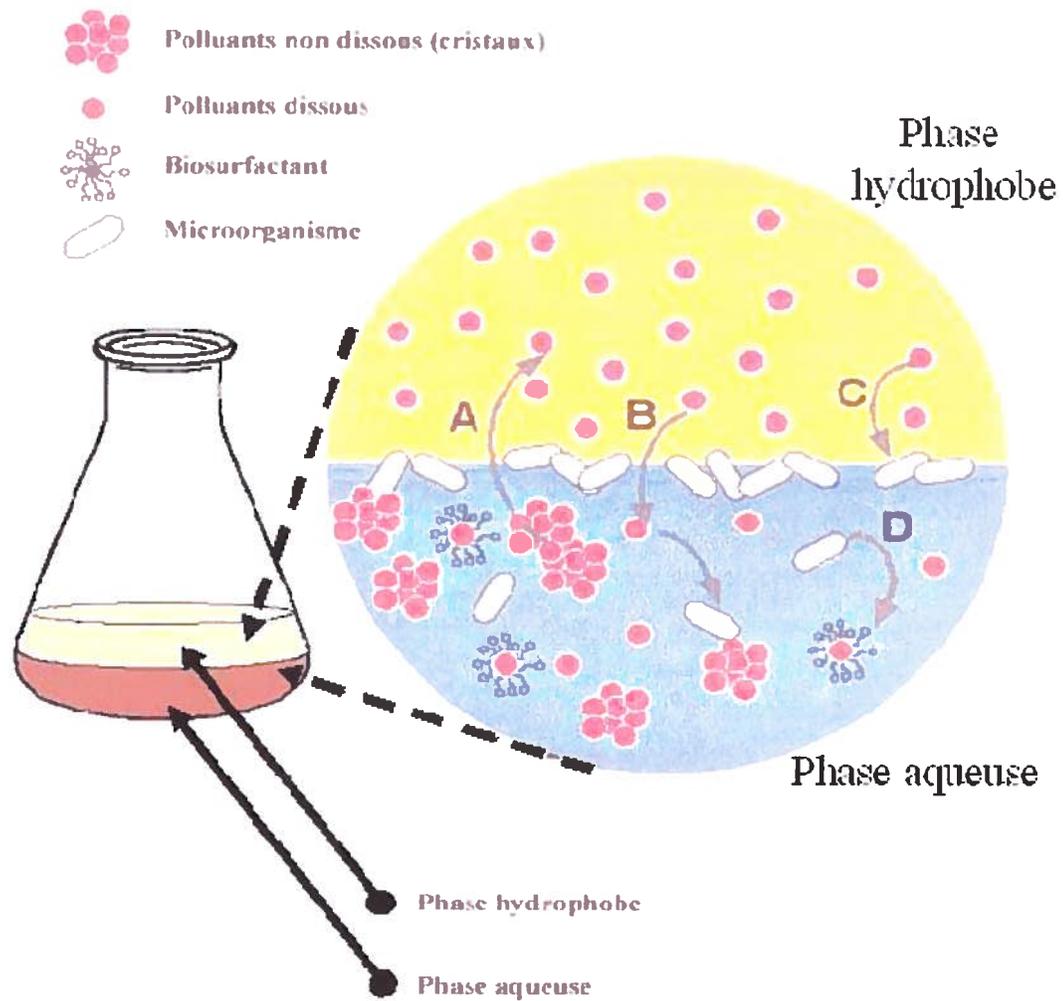


Figure 2.9. Schéma d'un système biphasique (modifié à partir de Gauthier, 2001; Déziel *et al.*, 1999).

2.5.2 Prise du substrat par les bactéries

Concernant les systèmes biphasiques, différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la façon dont les bactéries pouvaient entrer en contact avec les substrats peu solubles à dégrader. Le premier mécanisme implique un transfert du substrat de la phase hydrophobe vers la phase aqueuse pour y être dégradé. Ce mécanisme suppose donc que seul le substrat dissous dans la phase aqueuse est biodisponible et que le taux de dégradation dépend du taux de transfert de masse. Un deuxième mécanisme propose que les bactéries entreraient directement en contact avec la phase hydrophobe et pourraient former un biofilm à l'interphase. Dans ce cas, les bactéries auraient la propriété d'adhérer à l'interface aqueuse/organique et ainsi atteindre le polluant à une plus grande concentration (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b; Guieysse *et al.*, 2001). Lors de la formation d'un biofilm, certaines espèces bactériennes seraient particulièrement favorisées si elles possèdent des parois plus lipophiles. Par exemple, les bactéries du genre *Mycobacterium* et *Nocardia* possèdent des parois particulièrement hydrophobes qui leur permettraient d'être favorisées pour l'établissement d'un biofilm à l'interphase (Bastiaens *et al.*, 2000; Johnsen et Karlson, 2004). Le troisième mécanisme implique la production bactérienne de biosurfactants causant une émulsion ou la formation de micelles, donc une pseudo-solubilisation du polluant, qui peuvent être directement assimilées par les microorganismes (Déziel *et al.*, 1999). En fait, les trois mécanismes décrits ici peuvent se produire de façon consécutive ou simultanée dans un système biphasique. Tout dépend des microorganismes présents dans le système.

2.5.3 La sélection de la phase hydrophobe

Le choix de la phase hydrophobe est une étape critique puisqu'il peut avoir un impact sur le taux de transfert de masse et le taux de dégradation du polluant dans le système biphasique (MacLeod et Daugulis, 2003). Plusieurs solvants ont déjà été testés dans des systèmes biphasiques lors de la biodégradation de différents substrats. L'huile de silicone (diméthylpolysiloxane), le 2-undécanone, l'huile de paraffine, le pristane

(2,6,10,14-tetraméthylpentadecane) et le HMN (2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane) sont quelques exemples de solvants ayant été utilisés comme phase hydrophobe (Collins et Daugulis, 1997; Jimenez et Bartha, 1996; Gardin *et al.*, 1999; Marcoux, 1998). La phase organique choisie doit permettre une bonne capacité de solubilisation du substrat et être biocompatible, c'est-à-dire ne pas être toxique pour les microorganismes présents dans le système. La phase hydrophobe doit aussi être non-biodégradable puisqu'elle deviendrait ainsi une source de carbone possible pour les microorganismes présents et entrerait en compétition avec le composé qu'on désire faire biodégrader. En plus, le solvant sélectionné doit bien sûr avoir les propriétés physico-chimiques appropriées soit être non-miscible à l'eau, être non-volatile, être liquide à la température à laquelle les expériences sont prévues et ne pas avoir un coefficient de rétention trop élevé (MacLeod et Daugulis, 2003; Déziel *et al.*, 1999). En effet, un coefficient de rétention trop élevé emprisonnerait le substrat dissous dans la phase hydrophobe et empêcherait sa diffusion vers la phase aqueuse pour être dégradé (Efroymsen et Alexander, 1995).

2.5.4 Le taux de transfert de masse

Le taux de transfert de masse est relié à la vitesse à laquelle un composé passe d'une phase à une autre. Dans le cas des systèmes biphasiques, lorsqu'un composé peu soluble est dissous dans la phase hydrophobe, il diffuse lentement et de façon progressive vers la phase aqueuse selon leur solubilité maximale, mais aussi selon le rythme auquel les microorganismes peuvent métaboliser ce substrat. Souvent, la dégradation microbienne de ces composés peu solubles est limitée par le taux faible de transfert de masse de ces polluants vers la phase aqueuse (Johnsen et Karlson, 2004). Il est possible d'augmenter le taux de transfert de masse vers la phase aqueuse en augmentant la solubilisation du substrat ou le taux de dissolution. Pour ce faire, on peut augmenter la surface de contact entre le substrat et la phase aqueuse soit par une agitation mécanique ou par ajout d'agents tensioactifs (Déziel *et al.*, 1999). En effet, il est possible d'utiliser des biosurfactants pour augmenter le transfert des substrats de la phase hydrophobe vers la phase aqueuse. Les surfactants sont des molécules amphiphiles qui possèdent un pôle

plus hydrophobe et un plus hydrophile ce qui amène ces molécules à se retrouver à l'interphase aqueuse/organique. L'ajout de surfactant peut provoquer une émulsion de la phase hydrophobe et augmenter ainsi l'aire totale de l'interphase. Ces agents peuvent réduire la tension de surface à l'interphase et promouvoir une meilleure solubilisation de composés peu soluble (Déziel *et al.*, 1999).

2.5.5 Choix des microorganismes

La sélection des microorganismes qu'on désire utiliser pour dégrader un polluant est souvent une étape importante. Souvent, un enrichissement est nécessaire et permet l'acclimatation et la sélection d'organismes capables de dégrader le composé. L'enrichissement en système biphasique permet de maintenir des microorganismes en présence constante d'un substrat à une concentration peu élevée ou non toxique. L'étape d'enrichissement a donc un impact très important sur les bactéries sélectionnées et, par le fait même, le mode de consommation du substrat (Guiyesse *et al.*, 2001). Certaines bactéries peuvent être favorisées selon leur capacité à former un biofilm ou à produire des biosurfactants. D'autres bactéries seront enrichies par exemple si elles utilisent les produits de dégradation présents dans le système biphasique.

2.6 Conclusion et rappel des objectifs

Les HAP HPM sont plus difficilement dégradés dans l'environnement. L'utilisation d'un système biphasique et d'un consortium capable de minéraliser ces HAP HPM s'avère une méthode ingénieuse pour dégrader ces polluants plus récalcitrants. L'étude d'un consortium bactérien enrichi depuis quelques années au laboratoire du Dr Réjean Beaudet, de l'INRS-Institut Armand-Frappier, et capable de minéraliser les HAP HPM peut amener beaucoup d'informations sur les processus de dégradation de ces composés aromatiques. En effet, l'identification des bactéries présentes dans ce consortium par le séquençage des ADNr 16S et la détection de certains gènes de dégradation seront effectuées. De plus, le profil de diversité du consortium sera étudié suite à l'ajout d'inducteurs. Toutes ces expériences permettront d'acquérir encore plus de connaissances sur la dégradation des HAP HPM et les mécanismes impliqués.

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.1 Systèmes biphasiques

3.1.1 HAP

Des solutions de HAP tels le PYR, le CHY, le BAP, le PHE (Sigma-Aldrich Chemical Company, St-Louis, MO, É-U) ont été préparées pour certaines expériences. Des solutions mères de ces HAP ont été préparées dans du dichlorométhane (DCM; Anachemia Canada Inc., Montréal, Qc) à une concentration de 2000 mg/L pour le PYR, CHY et PHE et à 1000 mg/L pour le BAP. Une solution mère de 2-vinyl-naphtalène (2VN; Sigma-Aldrich Co.) a aussi été faite. Le 2VN a été dissous dans du N, N-diméthylformamide (DMF; HPLC grade, Sigma-Aldrich Co.) à une concentration de 1000 mg/L et a été utilisé comme standard interne au HPLC. Toutes ces solutions étaient conservées à l'obscurité à 4°C dans des tubes de verre ayant des bouchons en téflon. Des boules faites de cristaux de NAP (Recochem Inc., Montréal, Qc, Canada) ont aussi été utilisées pour certaines expériences. De petits sacs de coton fromage contenant deux boules de NAP étaient alors attachés au bouchon des systèmes biphasiques de façon à ce que les vapeurs de naphtalène sature l'atmosphère des systèmes biphasiques.

3.1.2 Extrait de sol

L'extrait de sol utilisé dans les systèmes biphasiques provenait d'un sol non-contaminé, le sol MS utilisé auparavant par Marcoux (1998). Il a alors été déterminé que le sol MS avait une teneur de 3% en matière organique et une composition de 50% de sable, 37% de silt et 13% d'argile. En vue de préparer de l'extrait de sol, le sol MS a été tout d'abord tamisé pour ne garder que des particules d'un diamètre inférieur à 1.2 mm et il a été conservé à 4°C. L'extrait de sol a été préparé en mélangeant 10% de sol MS dans du milieu Bushnell-Haas (BH; Difco Laboratories, Détroit, MI). Ce mélange a ensuite été stérilisé par autoclave durant 40 minutes, centrifugé à 2500g pendant 15 minutes (centrifugeuse Avanti-J25, Beckman Instruments Inc. Palo Alto, CA, É-U) pour finalement récupérer par décantation le surnageant qui a été autoclavé pour un autre 40 minutes. Ce surnageant était donc considéré comme de l'extrait de sol 10%.

3.1.3 Systèmes biphasiques

Le milieu de culture des systèmes biphasiques était généralement constitué de 35 mL de milieu BH, 35 mL d'extrait de sol 10%, 10 mL d'inoculum bactérien provenant d'une culture d'enrichissement déjà en agitation et de 20 mL d'huile de silicone à 20 centistokes (cSt) (diméthylpolysiloxane; Sigma Chemical Company, St-Louis, MO, É-U) dans des flasques de type Erlenmeyer de 500 mL. Ces cultures ont été incubées à 25°C à l'obscurité, en agitation constante à 150 rpm (Incubator G25, New Brunswick scientific company, New Jersey, É-U). Des témoins abiotiques ont aussi été utilisés et consistaient en un milieu dans lequel soit aucun inoculum n'a été ajouté ou l'inoculum a été tué par l'ajout d'azoture de sodium (NaN_3) (Fisher scientific, New Jersey, É-U) à une concentration finale de 4%.

Pour certaines expériences, des systèmes biphasiques ont aussi été faits dans des flasques de 250 mL tout en conservant environ les mêmes proportions des différents constituants. Ces systèmes contenaient 20 mL d'extrait de sol 10%, 20 mL de milieu BH, 10 mL d'huile de silicone contenant des HAP dissous et 5 mL d'inoculum.

L'huile de silicone formait la phase hydrophobe des systèmes biphasiques où les HAP ont été dissous. À partir des solutions mères, le PYR et le BAP ont été rajoutés à l'huile pour obtenir une concentration finale d'environ 100 mg/L et le CHY à une concentration de 70 mg/L. Le mélange d'huile de silicone et de HAP a été ensuite agité, à l'aide d'un barreau magnétique, sous vide pendant au moins 24 heures de façon à faire évaporer le DCM. La concentration des différents HAP dans l'huile de silicone a finalement été déterminée de façon plus précise par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (voir section 3.2).

3.1.4 Enrichissement

De façon à maintenir les capacités de dégradation du consortium bactérien, ce consortium a été maintenu constamment en présence de HAP HPM. Des repiquages ont donc eu lieu environ à tous les 21 jours : 10 mL de la phase aqueuse contenant des bactéries d'une culture d'enrichissement ont servi alors à inoculer un nouveau système biphasique. Les cultures d'enrichissement ont été préparées tel que décrit à la section précédente (voir section 3.1.3).

3.1.5 Conservation du consortium

Pour conserver le consortium bactérien, un échantillon de la phase aqueuse du système biphasique, contenant les microorganismes, a été mélangé en volume égal à du milieu liquide R2A contenant 50% de glycérol (Fisher Scientific). Ce mélange a été ensuite aliquoté dans des tubes cryogéniques et congelé à -80°C . Le milieu liquide R2A comprenait 0.05% d'extrait de levures, 0.05% de casamino acides, 0.05% de glucose, 0.05% d'amidon soluble, 0.03% de K_2HPO_4 , 0.03% de sodium pyrophosphate, 0.025% de tryptone, 0.025% de peptone et 0.0024% de MgSO_4 .

3.2 Extraction et dosage des HAP

3.2.1 Extraction des HAP dans l'huile de silicone

De façon à doser les HAP présents dans l'huile de silicone des systèmes biphasiques, la technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée. L'extraction des HAP de l'huile de silicone a été effectuée en prélevant un échantillon de 500 μL d'huile, en y ajoutant le standard interne (le 2-vinyl-naphtalène) à une concentration finale de 100 mg/L et en y ajoutant deux volumes de DMF. Ce mélange a été ensuite vortexé pendant 2 minutes de façon à permettre aux HAP de migrer de la phase d'huile de silicone vers la phase de DMF. Les phases ont ensuite été séparées par centrifugation à 2500 rpm (centrifugeuse CRU-5000, Damon/IEC Division) pendant 10 minutes. Après centrifugation, 500 μL de la phase supérieure, la phase de DMF contenant

les HAP, ont été recueillis dans un vial en verre pour HPLC (Chromatographic specialties, ON, Canada). Cinq cents μL d'un mélange d'acétonitrile (HPLC grade, EM Science, Gibbstown, NJ, É-U) et d'acide acétique 0.2% (v/v) (Anachemia Canada Inc.) ont été ajoutés pour un volume total de 1000 μL .

3.2.2 Analyse au HPLC

Le dosage des HAP extraits a été effectué par chromatographie de type phase inverse à l'aide d'un appareil HPLC (Waters Corporation, Milford, MA) comprenant un contrôleur #600, une pompe #600, un détecteur #486 (486 Tunable Absorbance Detector) et un injecteur automatique #717 plus. La colonne qui a été utilisée est une colonne Nova Pak® C18 de type phase inverse, de 3.9 x 150 mm (Waters Corporation). L'analyse des composés a été faite à une absorbance de 254 nm et le tout était contrôlé à l'aide de l'interface du logiciel Millennium³² Login (version 3.05.01) (Waters Corporation). Le débit de la phase mobile était de 2 mL/minute. Au début de la ronde d'analyse, cette phase mobile était constituée à 35% d'eau et à 65% d'acétonitrile, tous deux additionnés de 0.1% (v/v) d'acide acétique. Par la suite, un gradient linéaire a été effectué pour atteindre 85 % acétonitrile et 15% d'eau en 8 minutes. Puis finalement, la colonne a été rééquilibrée pendant 2 minutes à 65% d'acétonitrile.

Pour doser les HAP, des courbes de standards de différents HAP ont tout d'abord été effectuées. Des courbes de standards, de 0 à 125 mg/L pour le PYR, le CHY et le BAP ont été produites. Pour toutes ces courbes de standards, le 2-vinyl-naphtalène était présent comme standard interne à 100 ppm dans chaque échantillon de ces courbes.

3.3 Le dosage de la demande chimique en oxygène (DCO)

Le but était de doser la DCO de l'extrait de sol 10% utilisé dans les systèmes biphasiques. Tout d'abord, l'échantillon d'extrait de sol a été dilué 1 : 2 avec de l'eau milli-Q pour obtenir une valeur détectable de DCO se situant entre 200 et 800 mg/L. Deux mL et demi de l'échantillon pré-dilué a été déposé dans un tube de 12 mL (HACH,

Loveland, CO, É-U) puis 1.5 mL d'une solution acide de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$) a été ajouté dans le tube ainsi que 3.5 mL d'argent dilué dans l'acide sulfurique (Ag_2SO_4) agissant comme catalyseur de la réaction de digestion. Les tubes ont ensuite été placés pendant 2 heures dans un réacteur à DCO (modèle HACH 4560) à 150°C. Lors de la digestion, les ions dichromates ($Cr_2O_7^{2-}$, teinte orangée) sont réduits en ions chromiques (Cr^{3+} , teinte verdâtre) par les composés oxydables chimiquement. Suite à l'incubation et une fois les tubes refroidis, la concentration en ions chromiques a été déterminée par analyse colorimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre (modèle 6/20A, Perkin Elmer, Oakbrook, IL, É-U) à une longueur d'onde de 600 nm. Pour pouvoir comparer les résultats, une courbe standard a dû aussi être effectuée. Une solution mère d'acide phtalique de potassium (KHP) de 15 g/L a été préparée. À partir de la solution-mère de KHP, différentes dilutions (de 100 à 900 mg/L) ont été effectuées avec de l'eau milli-Q. Ces dilutions ont été traitées comme l'échantillon. Après avoir pris en note les absorbances correspondant à chaque concentration, une courbe standard a pu être faite et a servi à déterminer la DCO de l'extrait de sol 10%.

3.4 Techniques de biologie moléculaire

3.4.1 Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN ont été effectuées sur différents types d'échantillons soit des cultures bactériennes liquides, des colonies prélevées sur des géloses ou des échantillons de systèmes biphasiques. Les échantillons liquides ont toujours été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm (Centrifugeuse MC2, Desaga Sarstedt-Gruppe, Allemagne). Le culot bactérien était ensuite dispersé dans 250 μ L de tampon TEN (Tris HCl 50 mM, EDTA 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8.0) et 40 μ L de SDS 20% (sodium dodécyl-sulfate; ICN Biomedicals Inc., Cleveland, É-U). Lorsque des colonies étaient directement utilisées pour l'extraction, 2 à 3 colonies ont été recueillies et déposées dans un tube de 1.5 mL dans lequel on retrouvait aussi 250 μ L de tampon TEN et 40 μ L de SDS 20%. Dans les deux cas, le mélange bactérien a été transféré dans un tube contenant 250 mg de billes en verre de 0.25-0.50 mm (Fisher scientific). Les tubes ont été déposés dans l'appareil FastPrep FP120 (Thermo Savant, Holbrook, NY, É-U) qui permet un

broyage efficace des échantillons par agitation rapide des tubes. Le FastPrep a été utilisé pour deux rondes de 20 secondes à vitesse 4.0 lors d'extraction d'ADN de souches pures ou pour deux rondes de 40 secondes à vitesse 6.0 pour des complexes bactériens non caractérisés. Entre les deux rondes de broyage, les échantillons ont été déposés sur la glace durant 5 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a été récolté dans un autre tube auquel était ajouté 1 μ L d'ARNase (10 mg/mL) (USB Co., Cleveland, Ohio, É-U). L'échantillon a alors été laissé 10 à 15 minutes à la température de la pièce. L'équivalent d'un volume d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) (Fisher Scientific, A&C Produits Chimiques Américains, Montréal, Qc, Canada) a été par la suite ajouté au surnageant et une centrifugation de 5 minutes à 13 000 rpm a été effectuée. Le surnageant a été récolté dans un autre tube de 1.5 mL. L'équivalent d'un volume d'une solution de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) a été ajouté pour enlever toute trace de phénol pouvant être encore présent. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés 1 minute à 13 000 rpm. Le surnageant a été récolté et 2 volumes d'éthanol 95% (Fisher Scientific) et $\frac{1}{4}$ de volume d'acétate d'ammonium (A&C Produits Chimiques Américains) y ont été ajoutés. Ce mélange a été déposé à -20°C pour au minimum 30 minutes pour permettre la précipitation de l'ADN. Par la suite, les tubes ont été centrifugés 15 minutes à 13 000 rpm. Un lavage du culot a ensuite été effectué en ajoutant 200 μ L d'éthanol 70% (v/v) et en centrifugeant 2 minutes à 13 000 rpm. Les échantillons ont été ensuite séchés à l'air libre et dissous dans 50 μ L d' H_2O milli-Q. Les extractions d'ADN ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (voir section 3.4.2).

3.4.2 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN selon leur longueur et permet du même coup de vérifier la qualité de l'ADN extrait. Les gels d'agarose 1% ou 2% (p/v) ont été faits en dissolvant de l'agarose UltraPure (Invitrogen, Grand Island, NY, É-U) dans du tampon TAE 1X (1 mM EDTA, 40 mM Tris-acétate à pH 8.0). La solution a ensuite été refroidie pour polymériser dans un moule à gel dans lequel un peigne avait été placé. Les gels d'agarose ont ensuite été déposés dans une cuve

à électrophorèse (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, É-U) contenant du tampon TAE 1X.

Un tampon de charge (30% (v/v) glycérol (Fisher Scientific), 0.25% (p/v) de xylène cyanol (Sigma-Aldrich) et de 0.25% de bleu de bromophénol (Sigma-Aldrich)) a été ajouté à chaque échantillon d'ADN avant d'être chargé dans les puits du gel d'agarose. Dans un des puits du gel, environ 500 ng d'un marqueur de poids moléculaire a été chargé pour faciliter l'estimation des longueurs de fragments d'ADN sur le gel. Selon la longueur estimée des fragments d'ADN chargés sur le gel, deux marqueurs de poids moléculaire ont été utilisés. Les marqueurs de type « Gene Ruler™ 50 pb DNA ladder » (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, Allemagne), « 50 base pair ladder » (Amersham biosciences, Piscataway, NJ, É-U) et « λ *Sty* I », qui a été en fait obtenu par digestion de l'ADN du phage λ par l'enzyme de restriction *Sty* I, ont été utilisés. L'appareil à électrophorèse a ensuite été mis sous tension à 80-90 V pendant 30 à 90 minutes ou jusqu'à une distance de migration satisfaisante.

Une fois la migration terminée, le gel a été déposé dans une solution de bromure d'éthidium 0.5 μ g/ml (Sigma-Aldrich) pour une durée d'environ 10 minutes. Les gels ont ensuite été rincés dans l'eau milli-Q sous agitation durant 10 minutes. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant de l'ADN qui devient fluorescent sous les rayons UV. Les fragments d'ADN ont donc été visualisés sous les rayons ultraviolets à l'aide de l'appareil AlphaImager™3400 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, É-U) relié au logiciel «AlphaImager 3400 » (Alpha Innotech). L'appareil «Bio-Rad gel-Doc » (Bio-Rad Laboratories) relié au logiciel «Molecular Analyst » version 1.3 (Bio-Rad Laboratories) a aussi été utilisé pour visualiser l'ADN.

3.4.3 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Pour la plupart des expériences ciblant l'ADNr 16S, deux paires d'amorces ont été utilisées ciblant soit une partie variable du gène (partie V3) ou le gène en entier. Toutes les amorces utilisées ont été synthétisées par Alpha DNA (Montréal, Qc, Canada) et sont

indiquées dans le tableau 3.1 (voir p. 57). Les réactions de PCR ont été effectuées dans un volume total de 50 μL comprenant 5 μL de tampon Taq 10X (Tris-HCl 10 mM pH 9.0, KCl 50 mM, MgCl_2 1.5 mM) (Amersham Biosciences), 200 μM de déoxynucléotides triphosphates (dNTP) (Amersham Biosciences), 10 pmoles de chaque amorce, 20 μg de BSA (ICN Biomedicals Inc.), 2.5U de Taq ADN polymérase et 2 μL d'ADN. Le programme d'amplification utilisé pour l'amplification d'ADNr 16S a été le suivant : 94°C 3 min, 55°C 3 min, ensuite 30 cycles à 72°C 45 sec., 94°C 45 sec., 55°C 45 sec., et finalement un temps d'élongation à 72°C pour 10 min. Les amplifications ont été effectuées dans un appareil à PCR « GeneAmp PCR System 2700 » (Applied Biosystems). Concernant l'amorce 341F-GC, elle comprend une pince GC qui a permis d'utiliser les fragments amplifiés par les amorces 341F-GC et 534R lors des électrophorèses de type DGGE.

3.4.4 Électrophorèse sur gel à gradient dénaturant (DGGE)

Pour fabriquer le gel, une solution d'acrylamide 40% (Bio-Rad Laboratories) contenant 38 g d'acrylamide et 2 g de bis-acrylamide dans un volume total de 100 mL a tout d'abord été faite. Cette solution a été filtrée sur une membrane de 0.22 μm (Millipore Co., Bedford, MA, É-U) et gardée à 4°C. À partir de cette solution, deux solutions d'acrylamide 8% ont été générées. Une solution contenant 0% d'agent dénaturant a été faite en mélangeant 10 mL de la solution d'acrylamide 40% à 1 mL de TAE 50X et 39 mL d'eau milli-Q. La deuxième solution, qui est une solution à 80% dénaturant, a été faite en mélangeant 10 mL de la solution d'acrylamide 40%, 1 mL de TAE 50X et en ajoutant 16 mL de formamide déionisé (Fisher Scientific) et 16.8 g d'urée (Bio-Rad Laboratories) dans un volume final de 50 mL. Ces solutions ont été filtrées sur une membrane de 0.22 μm (Millipore Co.), placées à 4°C et utilisées la même journée de préférence. Le formamide déionisé et l'urée agissaient comme agent dénaturant dans le gel. À partir des solutions 0% et 80% dénaturant, des dilutions ont été effectuées pour obtenir une échelle de gradient allant de 25% à 75% dénaturant. Par exemple, pour obtenir 20 mL d'une solution 30% dénaturant, 12.5 mL de la solution 0% dénaturant étaient mélangés à 7.5 mL de la solution 80% dénaturant tandis que pour obtenir 20 mL

d'une solution 70% dénaturant, 2.5 mL de la solution 0% était ajouté à 17.5 mL de la solution 80%. Ces dernières solutions ont été dégazées par agitation dans une chambre anaérobie sous vide pendant 15 minutes. Par la suite, elles ont été refroidies sur glace.

Pour couler un gel ayant un gradient en agent dénaturant, une chambre à gradient (modèle 385, Bio-Rad Laboratories) a été utilisée. La solution la plus faible en dénaturant, la solution 30%, a été versée dans la chambre B tandis que la solution 70% a été versée dans la chambre A. Dans chacune des chambres, 100 μ L de persulfate d'ammonium 10% (p/v) (Bio-Rad Laboratories) ont été ajoutés de même que 10 μ L de tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Fisher Scientific). Ces deux produits ont été refroidis sur glace avant d'être utilisés. Une agitation a été générée dans la chambre A par l'ajout d'un barreau magnétique permettant le mélange des solutions lors de la mise en place verticale du levier. Le déplacement de ce levier a aussi permis le début d'écoulement de la solution dénaturante entre les deux vitres du montage (voir figure 3.1). Lorsque tout le gel a été coulé, un peigne a été inséré entre les deux vitres. La réaction de polymérisation du gel a duré environ 2 heures.

Après 2 heures, le peigne a été retiré et les puits ont été rincés en y injectant du TAE 1X. Le montage des vitres contenant le gel polymérisé a ensuite été inséré sur le support à migration du «DCode™ Universal Mutation Detection System» (Bio-RAD Laboratories) puis placé dans la cuve à migration contenant 7 L de tampon TAE 1X agité et chauffé à 60°C. Le gel a été laissé à équilibrer dans le tampon pendant environ 1 heure.

Lors d'un DGGE, entre 200 ng et 400 ng de matériel génétique (produits de PCR) des différents échantillons ont été mélangés à un volume égal ou un peu moindre de tampon de chargement (100 % (v/v) glycérol, 0.25 % (p/v) xylène cyanol et 0.25 % (p/v) de bleu de bromophénol). Les différents échantillons ont ensuite été chargés dans les puits et l'appareil a été mis sous tension à 100V pendant 16 heures à 60°C. La coloration du gel ainsi que l'observation sous UV des échantillons ont été faites comme à la section 3.4.2.

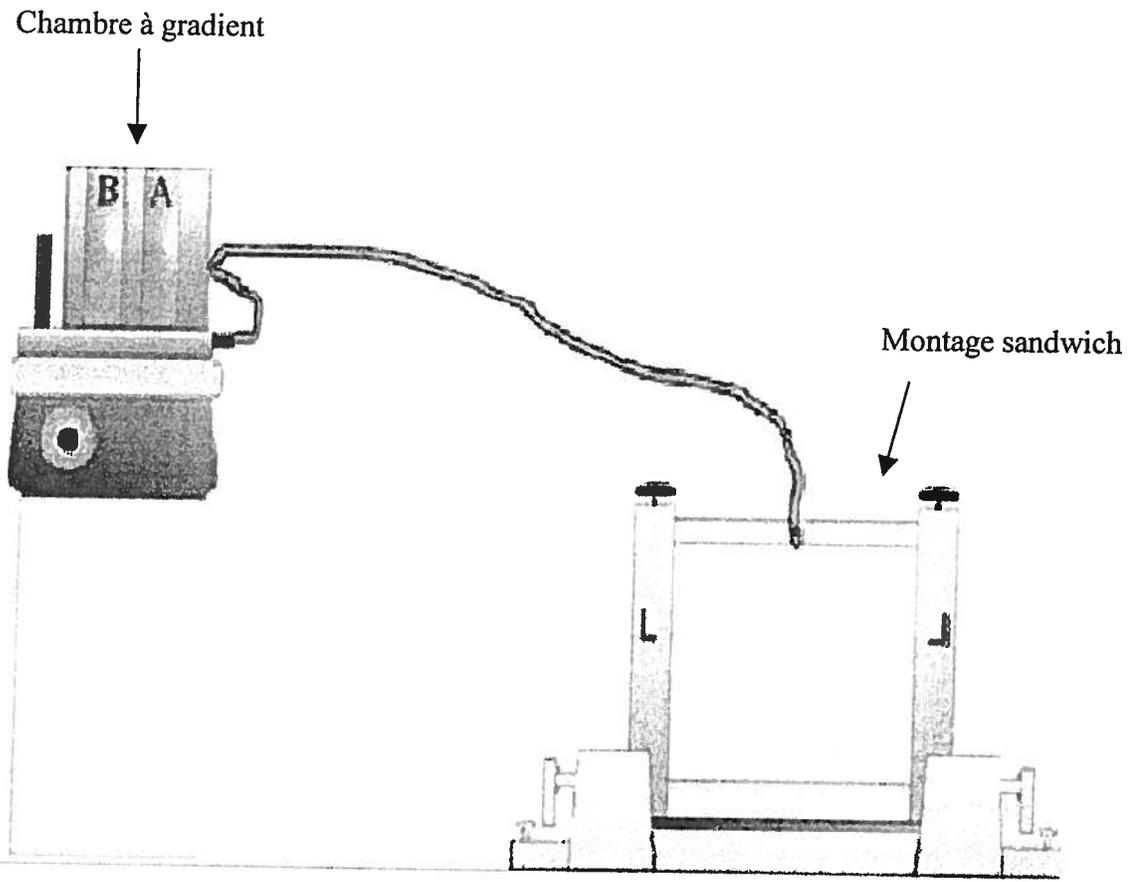


Figure 3.1. Appareillage et montage employé lors de la préparation d'un gel à gradient dénaturant utilisé dans la technique du DGGE.

3.5 *Élaboration d'une génothèque d'ADNr 16s*

3.5.1 Purification des produits de PCR servant au clonage

Après avoir déterminé l'échantillon d'ADN extrait d'un système biphasique qui allait être utilisé pour effectuer le clonage, deux types de PCR ont été réalisés avec les amorces PA et PH (voir tableau 3.1, p.57). Une amplification a été effectuée telle que décrite à la section 3.4.3, puis une autre avec un protocole dit « touchdown ». Le programme de la PCR « touchdown » a été le suivant :

94°C, 5 min.	} 1 cycle
94°C, 45 sec.	} 21 cycles (comprenant une baisse de la température d'hybridation de 2°C par 3 cycles)
65°C → 53°C, 45 sec.	
72°C, 45 sec.	
94°C, 45 sec.	} 14 cycles
51°C, 45 sec.	
72°C, 45 sec.	
72°C, 10 min.	} 1 cycle

Des volumes de 100 µL de produits de PCR ont été faits pour chaque type d'amplification. Par la suite, tous les produits ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (voir section 3.4.2) et ont été finalement concentrés dans un même tube.

En vue de faire un clonage à partir de ce produit de PCR, une purification de l'ADN ribosomal amplifié a été effectuée. Un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25 :24 :1) a été ajouté au tube contenant les produits de PCR regroupés. Une centrifugation de 2 minutes a été effectuée à 13 000 rpm. Le surnageant a été recueilli dans un autre tube auquel a été ajouté 1 volume de chloroforme/ alcool isoamylique (24 :1). Une centrifugation de 1 minute à 13 000 rpm a ensuite été effectuée. Le surnageant a été recueilli dans un autre tube. L'ADN a été précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol 95% (v/v) et ¼ de volume de AcNH₄ 10M. L'échantillon a ensuite été mis durant 30 minutes à -20°C. Par la suite, une centrifugation de 15 minutes à 13 000 rpm a été faite. Le surnageant a été jeté puis un lavage a été effectué en ajoutant 200 µL

d'éthanol 70 % (v/v) suivi d'une centrifugation de 2 minutes à 13 000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché à l'air libre puis dissous dans 90 µL d'eau milli-Q. Le produit de PCR purifié a aussi été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (voir section 3.4.2).

3.5.2 Ligation et transformation

La ligation des produits de PCR consistait à mélanger dans un tube 5 µL de tampon de ligation (2X rapid ligation buffer, Promega, Madison, WI, É-U), 1 µL du vecteur pGEM[®]-T Easy (Promega) (voir figure 3.2), 1 µL d'ADN ligase T4 et 3 µL de produit PCR pour un volume total de 10 µL. Deux ratios différents de « produits PCR : vecteur » ont été testés. Un ratio de 3 :1 et un de 5 :1. Pour le ratio de 5 :1, le volume de réaction total a été de 20 µL (10 µL de tampon, 1 µL vecteur, 2 µL ligase, 5 µL produits PCR et 2 µL d'H₂O). Les tubes contenant les différents mélanges ont été laissés durant 1 heure à la température de la pièce avant d'être incubés à 4°C durant toute la nuit.

La transformation des bactéries compétentes DH5α (*Escherichia coli* DH5α F⁻ Φ80*lacZ*ΔM15Δ(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻*) (Invitrogen) s'est déroulée comme suit : 5 µL de chaque réaction de la ligation ont été ajoutés à 100 µL de cellules compétentes DH5α en mélangeant légèrement. Ces mélanges ont été laissés 30 minutes sur glace avant d'être placés à 42°C pendant 45 secondes pour ensuite être remis rapidement dans la glace pendant 2 minutes. Chaque mélange a ensuite été ajouté à 950 µL de milieu SOC préchauffé à 37°C dans une éprouvette et agité à 225 rpm pendant 1 heure à 37°C. Le milieu SOC a été fait en ajoutant du glucose, à une concentration finale 0.01M, dans du milieu SOB à partir d'une solution de glucose 1M. Le milieu SOB est un milieu de culture qui comprend 2% (p/v) de bacto-tryptone (Difco laboratories), 0.5% (p/v) d'extrait de levure (Difco laboratories), 0.05 % (p/v) de NaCl et 2.5 mM de chlorure de potassium. Le pH a été ajusté à 7.0 avec du NaOH 10 N. Suite à la stérilisation de ce milieu par autoclavage, 0.01M de chlorure de magnésium (A&C Produits Chimiques Américains) a été ajouté. Après l'incubation d'une heure de chaque réaction de transformation, des volumes de 30 µL et 150 µL de

transformants ont été étalés sur des milieux gélosés LB/Ampi/Xgal/IPTG. Les géloses ont ensuite été incubées toute la nuit à 37°C jusqu'à observer la présence de colonies. Les géloses LB/Ampi/Xgal/IPTG ont été constituées de 1% (p/v) de bacto-tryptone, 0.5% (p/v) d'extrait de levure, 0.5% (p/v) de NaCl et 1.5% (p/v) d'agar. Le milieu LB ainsi fait a été autoclavé. Après stérilisation du milieu, 100 mg/L d'ampicilline (ICN Biochemicals) a été rajouté ainsi que 40 mg/L de X-GAL (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) et 120 mg/L d'IPTG (Amersham Biosciences).

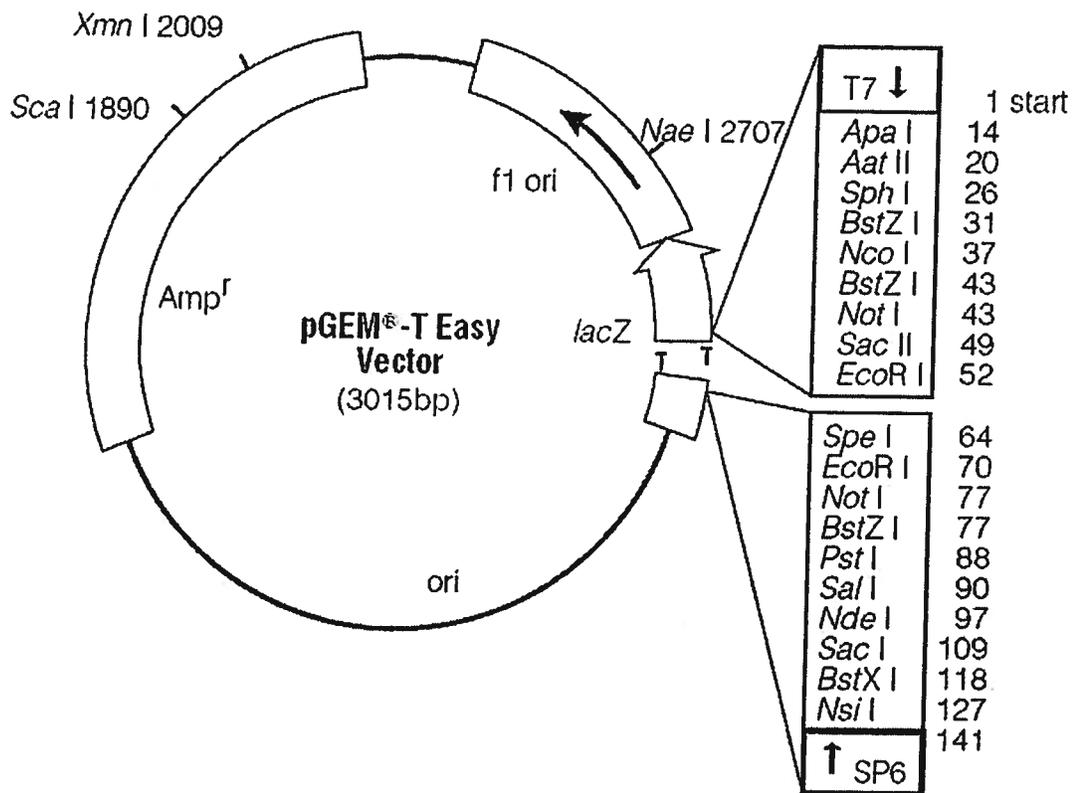


Figure 3.2. Vecteur pGEM[®]-T Easy utilisé dans l'étape de ligation lors du clonage des différents ADN_r 16S amplifiés par PCR.

3.5.3 Extraction d'ADN plasmidique et détection de faux-positifs

Dans le but de vérifier les clones obtenus, des extractions d'ADN plasmidique ont été effectuées. Près d'une centaine de colonies supposées avoir l'insert (colonies blanches) ont été testées en plus de quelques colonies non transformées (colonies bleues). Chaque colonie a été prélevée à l'aide d'un cure-dent stérile et a servi à ensemercer 2 mL de milieu SOC auquel de l'ampicilline a été ajouté à 100 mg/L. Les tubesensemencés ont été agités à 225 rpm durant 16 heures à 37°C pour permettre la croissance des clones. Suite à cette incubation, l'extraction d'ADN plasmidique se déroulait comme suit : 1 mL de chaque culture bactérienne a été prélevé et déposé dans un tube de 1.5 mL. Les tubes ont été centrifugés 30 secondes à 13 000 rpm. Le culot a été lavé en ajoutant 500 µL de TEN et recentrifugé 30 secondes à 13 000 rpm. Le culot a été ensuite dispersé dans 200 µL de TEN. Trois cents µL d'une solution de phénol/chloroforme/alcool isoamylique y ont été ajoutés avant d'être vortexé 30 secondes pour une obtenir une certaine émulsion. Les tubes ont été par la suite centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm. Deux cents µL de surnageant, dans lequel l'ADN se retrouvait, ont été recueillis et ajoutés à 50 µL d'acétate d'ammonium 10N. Cinq cents µL d'éthanol 95% ont aussi été ajoutés avant d'incuber les tubes à -20°C pour un minimum de 15 minutes. Par la suite, les tubes ont été centrifugés 10 minutes à 13 000 rpm. Le culot a été lavé en ajoutant 500 µL d'éthanol 70% (v/v) et en recentrifugeant 1 minute. Par la suite, les culots ont été laissés à l'air libre pour sécher et finalement le culot a été dissous dans 50 µL de ARNase 10 µg/mL. En parallèle, 150 µL des cultures bactériennes de chaque clone a été déposé dans un puits d'une plaque 96 puits. Dans chaque puits avait été ajouté une goutte de glycérol stérile (Fisher Scientific). Cette plaque a donc été congelée dans le but de conserver les différents échantillons.

Pour s'assurer que les extractions plasmidiques avaient bien fonctionné et du même coup confirmer la présence de l'insert dans le plasmide, l'ADN extrait de chaque clone a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Pour chaque clone testé, un mélange de 4 µL d'ADN extrait auquel était ajouté 2 µL de tampon de charge a été déposé dans un puits d'un gel d'agarose 1% (voir section 3.4.2).

3.5.4 Criblage des clones

Dans le but de regrouper les clones semblables, soit ceux qui ont le même insert (le même fragment d'ADNr 16S), un criblage des clones par co-migration sur DGGE et par l'utilisation d'enzyme de restriction a été effectué. Dans un premier temps, des DGGE ont été réalisés suite à l'amplification de la partie V3 des gènes d'ADNr 16S à partir de l'ADN extrait de chaque clone. Les amorces 341F-GC et 534R ont été utilisées (tableau 3.1). Après avoir vérifié les produits de PCR sur gel d'agarose 2%, 3 μ L de chaque réaction de PCR a été mélangé à 2 μ L de tampon de charge DGGE et déposés dans des puits d'un gel DGGE 25-75% dénaturant (voir section 3.4.4). Sur chacun des gels DGGE utilisés lors des criblages, les amplicons provenant de l'amplification des ADNr 16S par PCR sur l'échantillon ayant servi à produire la banque de clones ont été déposés dans le puits central dans le but de pouvoir servir de référence. À partir de l'analyse de la photo du gel obtenu et de la distance de migration des différents fragments, différents groupes de clones ont été formés.

Dans le but d'utiliser des enzymes de restriction pour le criblage de clones, des PCR ciblant le gène ribosomal 16S, avec les amorces PA et PH (tableau 3.1), ont été effectuées à partir de l'ADN extrait de chaque clone. La réaction de digestion enzymatique se préparait comme suit pour chaque clone en mélangeant 11 μ L d'H₂O milli-Q, 2 μ L de tampon T 10X (10 U/ μ L) de l'enzyme (Amersham Biosciences), 0.5 μ L d'enzyme de restriction *Afa* I (Amersham Biosciences) et 6.5 μ L de produits de PCR. Ce mélange a été incubé à 37°C pour toute la nuit. La réaction de digestion enzymatique a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 2%. Pour chaque réaction, les 20 μ L du mélange ont été déposés dans un puits du gel, de même que 5 μ L de l'échelle de poids moléculaire 50 pb dans un des puits. Le profil de digestion observé sur la photo du gel permettait de confirmer les groupes de clones déjà formés, de former des sous-groupes ou de replacer un clone dans un autre groupe.

3.6 Extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide

Les bandes désirées ont été excisées du gel lors de l'observation sous rayonnement UV et chaque bande a été déposée dans un tube de 1.5 mL. Pour éluer l'ADN contenu dans cette bande de gel, 500 µL de tampon d'élution (AcNH₄ 0.5M, acétate de magnésium 10mM, EDTA pH 8,0 1mM et SDS 1%) et les échantillons ont été incubés de 2 à 4 heures à 37°C. Par la suite, une centrifugation de 1 minute à 13000 rpm a eu lieu et le surnageant a été prélevé et déposé dans un tube. Le morceau de gel de polyacrylamide restant dans le tube a été lavé en ajoutant 250 µL de tampon d'élution et en centrifugeant 1 minute à 13 000 rpm. Le surnageant a été combiné dans le tube contenant déjà le surnageant recueilli. L'ADN a été précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol 100% et par une incubation à -20°C de 1 à 2 heures. Ensuite, les échantillons ont été centrifugés à 13 000 rpm durant 15 minutes. Le culot a été dissous dans 100 µL d'eau et 1/10 de volume de d'acétate de sodium 3M a été ajouté avant de procéder à nouveau à une précipitation d'ADN avec de l'éthanol 100% à -20°C pour finalement dissoudre l'ADN dans 10 à 20 µL d'eau. Cet ADN a ensuite été ré-amplifié par PCR (voir section 3.4.3) avec les amorces 341F (sans pince GC) et 534R, et le produit de PCR a été envoyé au séquençage (voir section 3.7).

3.7 Séquençage et analyse des séquences

Tous les produits de PCR ont été séquencés au Centre d'innovation Génome Québec (Montréal, QC, Canada). Une des deux amorces ayant servi à l'amplification a aussi été envoyée pour chaque échantillon à séquencer. Par exemple, concernant le séquençage des gènes d'ADNr 16S provenant des différents clones, l'amorce pA (8F) a été envoyée, ce sont donc les 800 à 1000 premiers nucléotides du gène qui ont été séquencés.

L'analyse des séquences a été effectuée tout d'abord grâce au logiciel «Chromas» version 2.23 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Les séquences revues et corrigées ont été comparées à celles présentes dans la banque de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) à l'aide du

programme « Blastn ». Le programme «FASTA» (EMBL-EBI European bioinformatics institute, <http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>) a aussi été utilisé pour l'analyse des séquences.

3.7.1 Élimination des chimères

Suite à l'analyse des séquences, une détection des séquences chimériques a été faite grâce à différents programmes. Les séquences chimériques sont générées lors de l'amplification par PCR et renferment deux séquences phylogénétiquement distinctes. Ces séquences proviennent d'un amplicon prématurément terminé qui se réhybride à un brin d'ADN étranger pour être finalement amplifié au complet lors du cycle d'amplification suivant (Huber *et al.*, 2004).

Les programmes «CHIMERA_CHECK» (ribosomal database project II; <http://35.8.164.52/cgis/chimera.cgi?su=SSU>), «BELLEROPHON» (BellerophonServer; <http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl>) et «PINTAIL» (Ashelford *et al.*, 2005; <http://www.cf.ac.uk/biosi/research/biosoft/index.html>) ont été utilisés.

3.7.2 Étude phylogénétique

Dans le but de faire l'étude phylogénétique des clones séquencés, certains programmes du logiciel *PHYLIP* version 3.65 ont été utilisés (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Le programme SEQBOOT a été utilisé dans le but de générer, suite à un *bootstrap*, 1000 répliqués des séquences. À partir de ce fichier généré par SEQBOOT, le programme DNADIST a été employé pour évaluer la distance entre les différentes séquences en acides nucléiques et générer l'analyse sous forme de matrices de distances. Le programme FITCH utilise ces matrices de distance pour estimer la phylogénie. Finalement, le programme CONSENSE a été utilisé pour générer un arbre phylogénique consensus.

3.8 Test de dégradation des HAP et profils de diversité

Dans le but de suivre la dégradation des HAP en parallèle avec la diversité bactérienne présente dans les cultures biphasiques, certaines expériences en duplicata ont été effectuées. Des systèmes contenant 20 mL d'extrait de sol 10%, 20 mL de milieu BH, 10 mL d'huile de silicone contenant les HAP et 5 mL d'inoculum bactérien (sauf pour le témoin abiotique) ont été préparés. Dans le cas des expériences concernant la dégradation du CHY ou du BAP seuls, les systèmes biphasiques ont été constitués tel que décrit à la section 3.1.3 pour un volume total de 0.1L. Ces cultures ont été agitées à l'obscurité à 150 rpm à la température de l'agitateur (27-28°C). Pour suivre la dégradation des HAP, des échantillons d'huile de silicone ont été pris à différents temps puis dosés au HPLC (voir section 3.2). Lorsqu'une baisse importante d'un des HAP étudiés était observée, un échantillon des cultures biphasiques a été pris. Pour observer si la diversité était différente à l'interface comparée à celle présente dans la phase aqueuse, l'échantillon pris comprenait du milieu aqueux et aussi une portion d'huile de silicone. Ces échantillons ont été centrifugés 10 minutes à 2000 rpm. La biomasse à l'interface a été recueillie dans un tube de 1.5 mL à l'aide d'une pipette Pasteur puis recentrifugée à 13 000 rpm durant 2 minutes pour faire détacher les bactéries. L'ADN des différents culots bactériens recueillis a été extrait (voir section 3.4.1) puis un PCR-DGGE (30-70%) a été effectué à partir de ces échantillons d'ADN.

3.9 Effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM et sur la diversité du consortium

Quatre types de systèmes biphasiques ont été faits tel que décrit à la section 3.1.3: [1] sans ajout de HAP FPM, [2] contenant du NAP (vapeur des boules de NAP), [3] contenant du PHE, [4] puis finalement contenant de l'azote de sodium (4% v/v) (témoins abiotiques). Dans le cas des cultures avec du PHE, des ajouts de 10 mg de cristaux de PHE directement dans l'huile de silicone du système biphasique ont été faits à chaque 1 ou 2 jours et ce pendant 14 jours. Les essais ont été faits en duplicata. Les microorganismes utilisés dans l'expérience provenaient du consortium et ont été obtenus

d'un système biphasique en agitation depuis 12 jours. La dégradation des HAP a été suivie par HPLC durant 33 jours. Des échantillons ont été pris dans ces systèmes biphasiques aux jours 0, 13 et 34 dans la phase aqueuse, à l'interface et sur le cerne qui se forme à l'intérieur des flasques dû à l'agitation constante. Des extractions d'ADN ont été faites sur ces échantillons (voir section 3.4.1). Un PCR-DGGE (30-70% dénaturant) a été réalisé en amplifiant la partie V3 des ADNr 16S des échantillons.

3.10 Isolement et caractérisation de microorganismes provenant du consortium

3.10.1 Isolement de différentes colonies

À partir d'un échantillon de la phase aqueuse d'un système biphasique (culture d'enrichissement du 20^e repiquage, au jour 16), différentes dilutions ont été effectuées (10^{-1} à 10^{-9}). Pour chaque dilution, 10 μ L ont été étalés sur des géloses R2A (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, É-U) qui ont été incubées à 30°C durant 5 jours ou jusqu'à confluence. Suite à l'incubation, différentes colonies présentant des morphologies différentes ont été repiquées sur milieu R2A pour les purifier.

3.10.2 Identification des souches

Suite à l'extraction d'ADN (voir section 3.4.1) de chacune des souches, une amplification du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été effectuée (voir section 3.4.3). Le séquençage de ces amplicons a permis l'affiliation de plusieurs souches grâce à la comparaison avec les séquences provenant des banques de données.

3.10.3 Test de vaporisation de HAP sur gélose

Ce test de vaporisation a permis de détecter les bactéries ayant le potentiel de dégrader le HAP vaporisé. Le test de vaporisation des HAP dérive d'un test initialement décrit par Sylvestre (1980) où était vaporisé du *p*-chlorobiphényle et a été adapté aux

HAP par Kiyohara *et al.* (1982). Lorsqu'il y a dégradation du HAP vaporisé, il y a formation d'une zone claire ou apparition d'un pigment.

Pour effectuer ce test, les différentes souches étudiées ont d'abord été inoculées sur une surface de 0.5 à 1 cm² sur géloses R2A, BHY (milieu BH avec extrait de levure) et BHY additionné de salicylate de sodium (Sigma-Aldrich), à raison de quatre souches différentes par gélose. Deux souches témoins ont aussi été utilisées soit les souches *Sphingomonas* sp. 107-6 et *Pseudomonas aeruginosa* 57 (Dagher *et al.*, 1997). Les géloses inoculées ont été ensuite incubées toute la nuit à 30°C. Les HAP vaporisés ont été le NAP, PHE, PYR et CHY. Des solutions mères de 2% (p/v) dans l'acétone (HPLC grade, EM Science) de NAP et PHE et de 1% (p/v) dans le DCM pour le PYR et le CHY ont été faites. Elles ont été conservées à l'obscurité. Pour effectuer la vaporisation des HAP, un vaporisateur de réactifs pour chromatographie en couche mince (General Glassblowing, Richmond, CA) a été utilisé. La vaporisation des HAP sur les géloses préincubées s'est faite sous une hotte chimique. Les géloses ont ensuite été placées dans des sacs hermétiques pour limiter la volatilisation du HAP et réincubées à 30°C pour permettre la formation d'une zone claire (halo de dégradation) et/ou d'un pigment. La présence de zones claires ou de pigments était déterminée par un examen à l'œil nu ou à l'aide d'un binoculaire.

3.10.4 Test de l'indole

Le test de l'indole est une méthode indirecte permettant la détection de certaines dioxygénases dont la NAP dioxygénase qui est la première enzyme impliquée dans la voie de dégradation du NAP. En effet, Ensley *et al.* (1983) ont remarqué que cette enzyme catalyse la transformation de l'indole en indigo ce qui mène à la coloration bleu foncé des colonies impliquées. Les souches testées ont été inoculées comme à la section précédente sur une même gélose R2A avec aussi un témoin positif, la souche *Pseudomonas aeruginosa* 57. Les cristaux d'indole (Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans les couvercles de Pétri incubés à l'envers. Les géloses ont été déposées dans une jarre fermée hermétiquement. L'indole, étant très volatil, saturait donc tout l'air de la jarre. Un

tube contenant des cristaux de NAP avait aussi été ajouté dans la jarre pour induire l'enzyme. L'incubation des géloses s'est faite à 30°C durant 2 jours. Pour le témoin positif, la coloration bleue était présente après seulement quelques heures.

3.10.5 Reconstitution d'un consortium

3.10.5.1 Croissance des souches

Des cultures bactériennes des souches ont été préparées en milieu liquide R2A. Ces cultures ont été agitées à 250 rpm à 27°C jusqu'à obtenir des densités optiques (DO_{600nm}) se situant entre 0.3 et 0.8. Par la suite, 5 mL de chaque souche ont été centrifugés dans des tubes de 1.5 mL à 13 000 rpm durant 5 minutes. Les culots bactériens ont été lavés une fois avec du milieu BH, recentrifugés une autre fois et dispersés dans 5 mL de milieu BH de façon à ne pas incorporer de milieu R2A dans les systèmes biphasiques lors de l'ajout de l'inoculum.

3.10.5.2 Préparation des systèmes biphasiques

Les systèmes biphasiques expérimentaux ont été constitués (tel qu'à la section 3.1.3) d'extrait de sol 10% (40 mL d'extrait de sol pour cette expérience), de milieu BH, d'huile de silicone contenant des HAP et d'un inoculum. Pour cette expérience, 4 types de systèmes biphasiques ont été mis en marche. [1] L'inoculum était constitué d'un mélange de 500 μ L de chaque souche bactérienne. [2] Seuls 500 μ L de la souche S9 ajoutés à 4.5 mL de milieu BH constituait l'inoculum. [3] Cinq cents μ L de chaque souche sauf la souche S9 ont servi à faire l'inoculum de départ. [4] Finalement le système témoin était inoculé avec les 11 souches, mais de l'azote de sodium (4% concentration finale) a été aussi ajouté dans le but de tuer toutes les bactéries. Tous les systèmes ont été faits en duplicata et agités à l'obscurité à 150 rpm à 27°C.

3.10.5.3 Vérification de la présence de cométabolisme

Cette expérience avait pour but de vérifier si la dégradation des HAP effectuée par la souche S9 était due à une réaction de cométabolisme. Trois différents types de

systèmes biphasiques ont été faits. Un premier type de système était constitué de 35 mL de milieu BH, 10 mL d'huile de silicone contenant des HAP dissous et 5 mL d'inoculum (souche S9 seulement dispersée dans du milieu BH). Ce système a été fait en duplicata. Un deuxième type de système contenait les mêmes éléments que le premier avec en plus de l'azote de sodium (4% concentration finale) (un témoin négatif). Finalement, un témoin positif de la dégradation des HAP a été effectué dans une flasque contenant 20 mL d'extrait de sol 10%, 15 mL de milieu BH, 10 mL d'huile de silicone contenant des HAP dissous et 5 mL d'une culture de la souche S9 dispersée dans du milieu BH. Tous les systèmes biphasiques ont été mis dans un agitateur à l'obscurité, à 150 rpm et à 27°C. La dégradation des HAP a été suivie par le dosage des HAP présents dans les échantillons d'huile de silicone qui ont été pris à différents temps puis dosés au HPLC (voir section 3.2).

3.11 Détection de gènes de dégradation de produits aromatiques

3.11.1 Conception et synthèse des amorces

Les amorces ciblant différents gènes de dégradation de produits aromatiques ont été générées par alignement de séquences à l'aide du logiciel *BioEdit Sequence Alignment Editor* version 6.0.6 (Isis Pharmaceuticals Inc., CA, É-U) et des séquences nucléiques de gènes de dégradation trouvées dans les banques de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le meilleur alignement a été effectué à l'aide du logiciel *ClustalW Multiple Alignment* et a permis de dériver des séquences consensus. À partir de ces séquences consensus, les amorces les moins dégénérées possibles ont été synthétisées. Pour certains gènes, les séquences des acides aminés ont été utilisées pour trouver le meilleur alignement ou pour détecter des sous-groupes possibles de gènes. Les amorces ont été synthétisées chez Alpha DNA (Montréal, Qc, Canada) (voir tableau 3.1).

3.11.2 Amplification des gènes de dégradation et séquençage

Pour l'amplification des gènes de dégradation, les réactions de PCR (voir section 3.4.3) comprenaient 50 pmoles de chaque amorce. Pour chaque set d'amorces, la température d'hybridation optimale a été testée à l'aide d'un PCR à gradient, le *RoboCycler Gradient 96* (Stratagene Inc., La Jolla, CA, É-U). De 35 à 40 cycles ont été effectués, selon les amorces, pour amplifier les différents gènes de dégradation. L'appareil à PCR « GeneAmp PCR System 2700 » (Applied Biosystems) a aussi été utilisé lorsque la température d'hybridation optimale avait été déterminée pour la paire d'amorces. Le tableau 3.1 comprend les différentes amorces utilisées avec la température d'hybridation ainsi que la longueur des fragments attendus. La présence de ces gènes a été testée sur l'ADN extrait des différentes souches obtenues à la section 3.10 ainsi que sur l'ADN total d'un échantillon du consortium. Les souches contrôles utilisées ont été la souche *Pseudomonas aeruginosa* 57 pour les paires d'amorces ciblant *nahAc* et *xyIE* (tout), la souche *Sphingomonas* sp. 107-6 (Dagher *et al.*, 1997) pour la présence des gènes *xyIE* (Sphingo) et *bphC2* (Sphingo) et la souche *Mycobacterium gilvum* B1 (Gauthier *et al.*, 2003) pour la détection du gène *nidA*. Pour confirmer les gènes amplifiés et le pourcentage d'homologie avec d'autres gènes dans les banques de données, les produits de PCR ont été envoyés au séquençage (voir section 3.7).

Amplification ciblant différents gènes de dégradation de composés aromatiques (suite)				
Amorce	Gène ou région ciblée	Séquence ^c	Longueur du fragment attendue (pb)	Température d'hybridation
nidA1-F	sous-unité alpha de la NAP dioxygénase chez les mycobactéries	5'- ATGACCACCCGAAACAACC-3'	1360	57
nidA2-R		5'- GCTGACCCCATGTATTCCA-3'		
PhnAcl-F	sous-unité alpha de la NAP dioxygénase	5'- GCMTTITYTSAAYGTTTGC-3'	780	—
PhnAc2-R		5'- GRCATSTCTTTTTTCBACB -3'		
BphC-P1-F	2,3- dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase chez <i>Pseudomonas</i>	5'-TTGGGMTACMTSGGSTTY -3'	725	—
BphC-P2-R		5'- TGGTCRTTGGTGTGGCGY -3'		
BphC-S1-F	2,3- dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase chez <i>Sphingomonas</i>	5'- GTCACSGAACTCGGYTAY-3'	840	56
BphC-S2-R		5'- TCGCGGGTGTAGTATTCC-3'		
todC-P1-F	toluène dioxygénase chez <i>Pseudomonas</i>	5'-AATCCTTCGGCGWGCCTGA -3'	510	—
todC-P2-F		5'- AGACGTTCCGGCCGCCCTTT-3'		
todC-U1-F	toluène dioxygénase	5'-CCCCGACATGGACTTGTCC-3'	450	—
todC-U2-F		5'- GTCGTCCTGCTCAAACAC-3'		

a : amorces adaptées de Edwards *et al.* (1989)

b : amorces décrites par Muyzer *et al.* (1993)

c : séquences dégénérées comprenant les codes IUB (NC-IUB, 1985)

Y : C ou T H : A ou C ou T S : C ou G R : A ou G
M : A ou C B : C ou G ou T K : G ou T W : A ou T

— : température d'hybridation optimale non déterminée pour ces paires d'amorces. Aucune amplification n'a pu être observée lors des PCR à gradient effectués et dont les différentes températures d'hybridation testées allaient de 47°C à 61°C.

4. RÉSULTATS

4.1 Étude de la dégradation des HAP dans les systèmes biphasiques

4.1.1 Cinétique de dégradation des HAP et profil de diversité du consortium

La dégradation des HAP et la diversité bactérienne du consortium ont été suivies dans des systèmes biphasiques contenant du PYR, du CHY et du BAP. La figure 4.1 permet d'observer que le PYR a été le premier HAP à être dégradé. En effet, le consortium a pu dégrader tout le PYR présent dans les systèmes biphasiques en 7 jours. Par la suite, près de 83% du CHY a été dégradé en 28 jours. Aucune dégradation du BAP n'a été observée dans les flasques. De plus, aucune dégradation des différents HAP n'a eu lieu dans le témoin abiotique.

De façon à pouvoir étudier la diversité présente dans le consortium, des échantillons ont été pris à différents temps et à différents endroits (dans la phase aqueuse et à l'interface des deux phases) dans les flasques. Des échantillons ont été pris aux jours 3, 8, 17 et 31 et l'ADN total de ces échantillons a été extrait. À partir de ces échantillons d'ADN, un profil migratoire des ADN ribosomiaux a été fait par PCR-DGGE, ce qui a permis d'obtenir une représentation de la diversité bactérienne présente dans le consortium. Comme le montre la figure 4.2, la diversité démontrée par ces profils permet de remarquer au moins une vingtaine de bandes différentes. En principe, une bande équivaut à une espèce sur un profil DGGE, mais ceci ne demeure tout de même qu'une estimation de la diversité présente. À la figure 4.2, les profils de la diversité retrouvée dans la phase aqueuse sont pratiquement les mêmes tout au long de l'expérience comparés aux profils de diversité provenant de l'interface. Par contre, il est possible de constater que certaines bandes tendent à disparaître complètement aux jours 17 et 31.

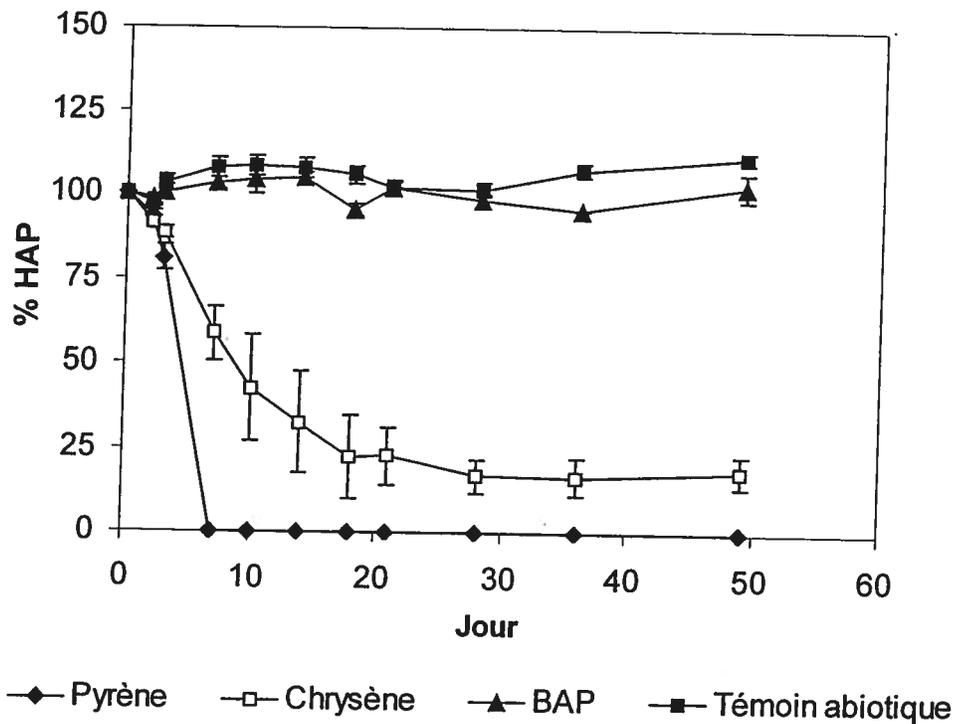


Figure 4.1. Suivi de la dégradation des différents HAP présents dans les systèmes biphasiques durant 49 jours. La quantité initiale de HAP utilisé a été 109 mg/L de PYR, 39 mg/L de CHY et 131 mg/L de BAP. Les essais ont été faits en duplicata.

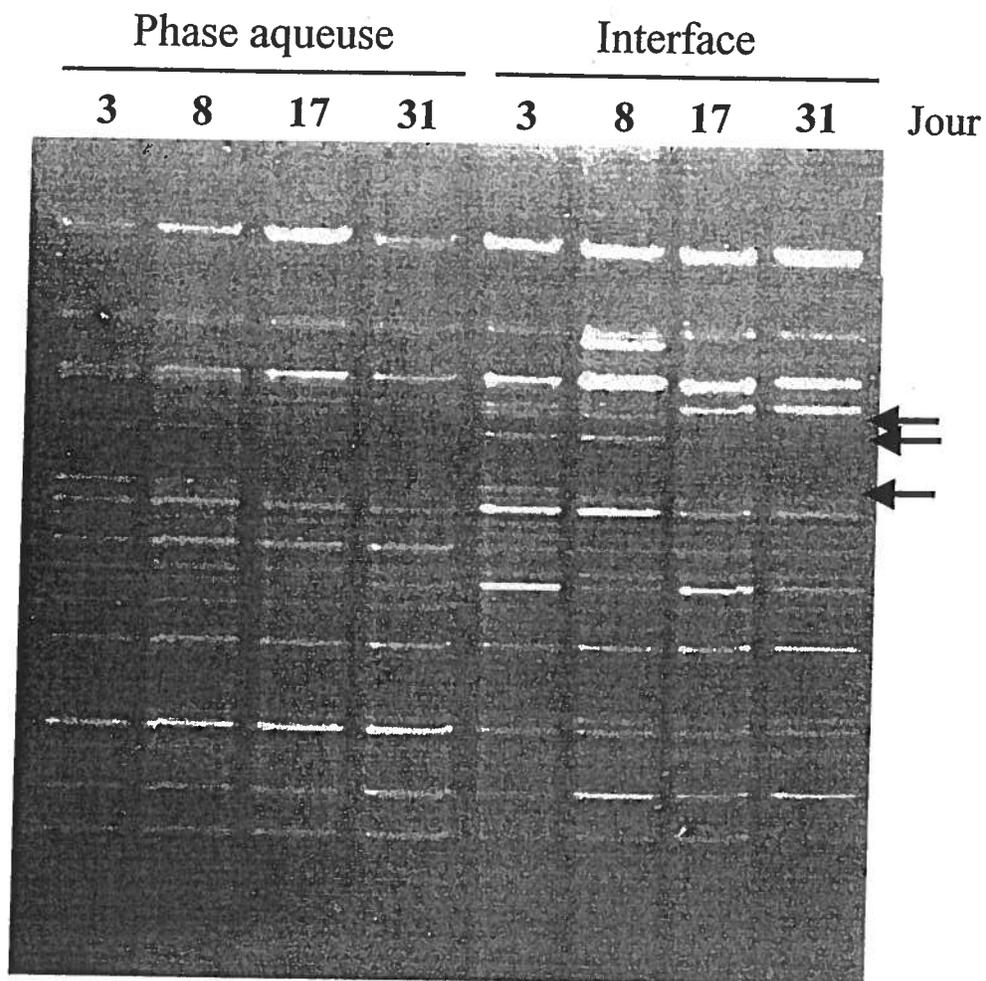


Figure 4.2. Profils de la diversité bactérienne présente dans la phase aqueuse et à l'interface dans les systèmes biphasiques étudiés. L'ADN total a été extrait des échantillons prélevés aux différents jours. Les gènes 16S ribosomiaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés par DGGE (gel d'acrylamide 8% avec un gradient dénaturant allant de 30% à 70%) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. Les flèches montrent 3 bandes qui tendent à disparaître complètement aux jours 17 et 31 dans la phase aqueuse et à l'interface.

4.1.2 Étude de la dégradation des HAP seuls et profils de diversité associés

Le but de cette expérience a été de vérifier si le fait de maintenir le consortium bactérien en présence d'un seul HAP provoquerait des changements dans les profils de

diversité bactérienne. Des systèmes biphasiques ont donc été préparés pour chaque HAP étudié soit le PYR, le CHY et le BAP. Pour s'assurer qu'une sélection de la diversité aurait la possibilité d'être observée, trois repiquages successifs, ayant eu lieu lorsque la dégradation du HAP était presque complète, ont été effectués pour chaque culture de façon à maintenir plus longtemps le consortium en présence du HAP étudié. À différents temps, des échantillons de la phase aqueuse, de l'interface et du cerne (accumulation de matières retrouvée sur les parois de la flasque suite à l'agitation constante du système biphasique) ont été pris pour en extraire l'ADN total. Des profils de diversité ont été ensuite obtenus par PCR-DGGE.

Dans toutes les cultures contenant du PYR, la dégradation a été complétée en 3 à 5 jours (figure 4.3). En fait, la dégradation s'est accélérée au cours des repiquages, passant de 5 jours pour dégrader le PYR dans la culture de départ (1x) à seulement 3 jours dans la culture du dernier repiquage (4x). La figure 4.4 montre les différents profils de diversité obtenus. Il est possible de remarquer que la population bactérienne retrouvée à l'interface a été peu importante dans la culture de départ après 5 jours de dégradation. De plus, aucun cerne n'était présent dans cette première culture. L'interface de la culture 4x s'est avérée beaucoup plus peuplée au niveau bactérien et un cerne a aussi été observé et analysé. La diversité bactérienne présente dans les échantillons analysés sur DGGE a été la même dans la première culture (1x) et dans la culture du 3^e repiquage (4x).

Concernant l'étude du CHY, la présente expérience a montré une dégradation de plus de 80% du CHY en moins de 20 jours dans les quatre cultures (figure 4.5). Dans la culture 3X, la presque totalité du CHY (99.6 %) a été dégradé en 14 jours. Une diminution de 25% du CHY dans le témoin abiotique a été observée dans les 6 premiers jours, mais s'est stabilisé par la suite. Les profils de diversité obtenus grâce aux différents échantillons recueillis ont démontré encore une fois une grande diversité tout au long des repiquages (figure 4.6). Aucun cerne n'a été présent dans la culture 1X de départ. La population bactérienne à l'interface a été de plus en plus considérable au cours de l'expérience et est devenue très importante dans la culture 4X. De plus, le profil migratoire provenant de la culture 4X a changé par rapport à celui de la culture 1X.

Certaines bandes, correspondant donc à certaines espèces bactériennes, ont été retrouvées de façon beaucoup plus importante au niveau du cerne tandis qu'elles ont été pratiquement absentes dans les autres échantillons. En général, dans une même culture la diversité présente dans la phase aqueuse et à l'interface a été sensiblement la même. Seules quelques bandes ont différées, étant présentes dans la phase aqueuse et absentes à l'interface.

Aucune dégradation significative de BAP (125 mg/L) n'a eu lieu au cours de cette expérience, il n'a donc pas été possible de déterminer si un profil de diversité différent aurait été observé.

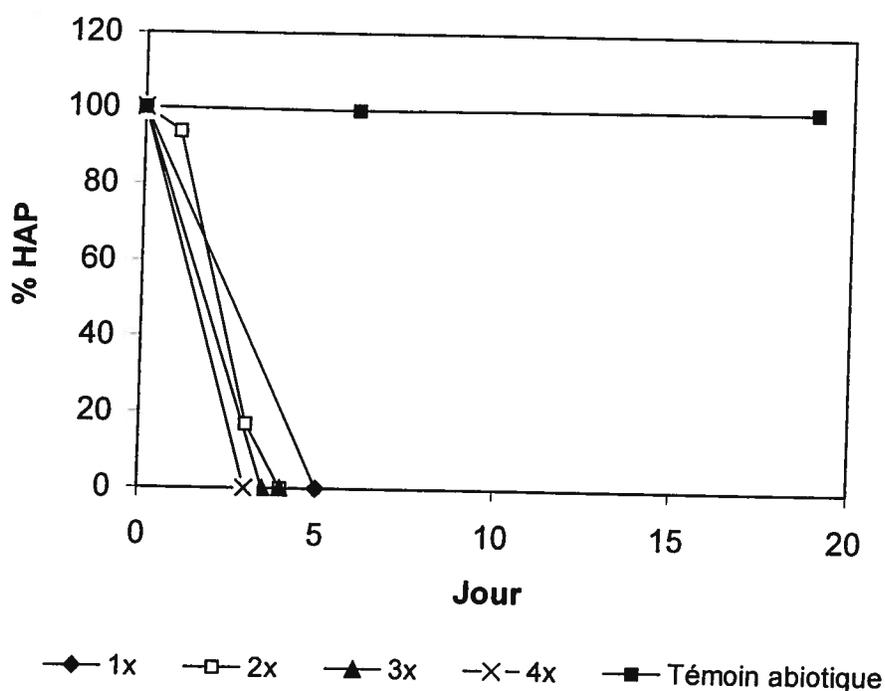


Figure 4.3. Cinétique de dégradation du PYR dans des systèmes biphasiques. La culture 1x représente la culture de départ et les trois autres (2x, 3x et 4x), les cultures de repiquage. La quantité initiale de PYR était de 134 mg/L dans les cultures. Chaque culture n'a été faite qu'en un seul exemplaire.

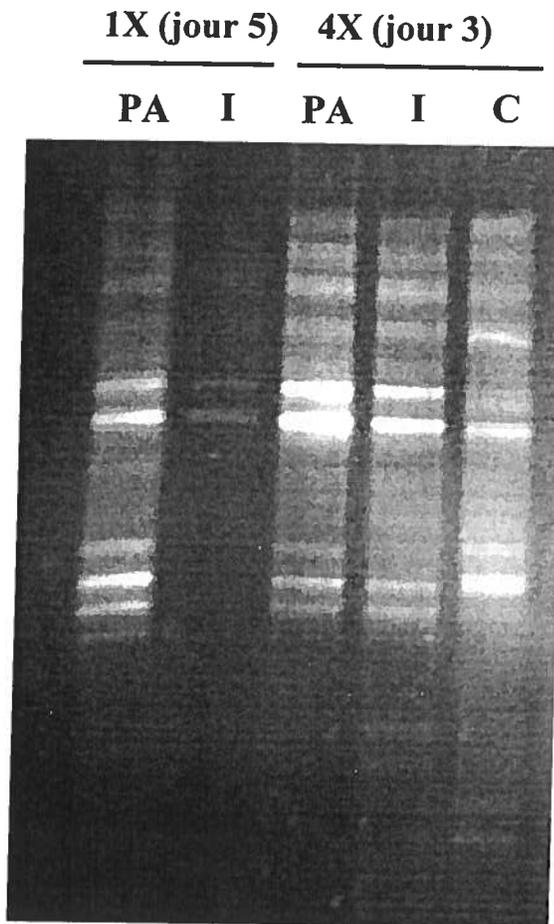


Figure 4.4. Profil de la diversité bactérienne dégradant le PYR dans la première et la quatrième cultures (après 3 repiquages). L'ADN total a été extrait des différents échantillons prélevés. Les gènes 16S ribosomiaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés par DGGE (gel d'acrylamide 8% avec un gradient dénaturant allant de 30% à 80%) et révélés par coloration au bromure d'éthidium.
 PA : phase aqueuse; I : interface; C : cerne

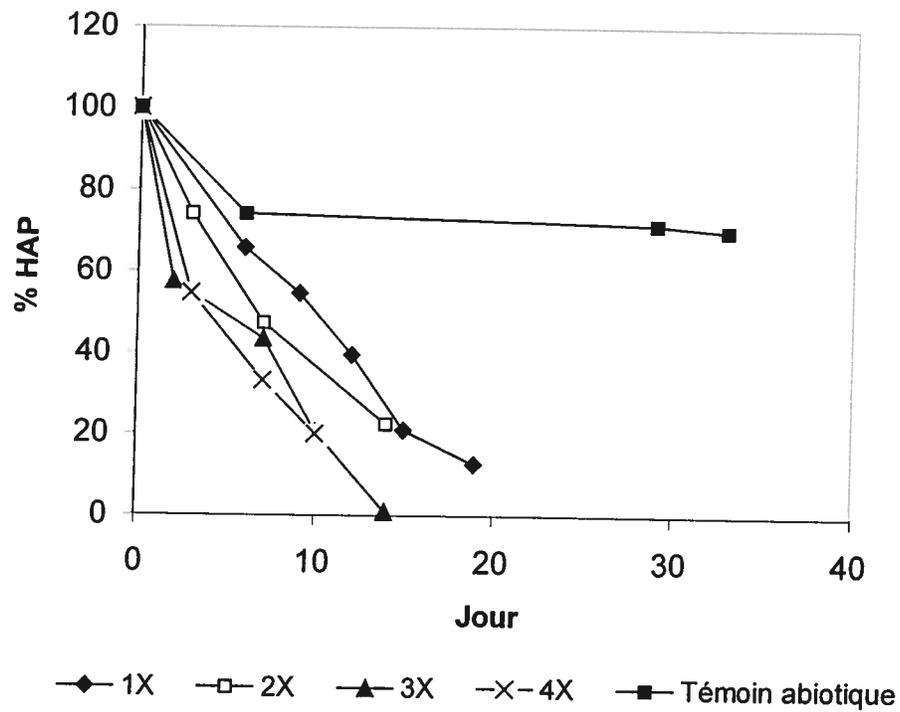


Figure 4.5. Cinétique de dégradation du CHY dans les systèmes biphasiques. La culture 1X représente la culture de départ et les trois autres (2X, 3X et 4X), les cultures de repiquage. Les cultures 2X, 3X et 4X contenaient initialement 44 mg/L de CHY tandis que la culture 1X et le témoin abiotique contenaient 125 mg/L de CHY. Chaque culture n'a été faite qu'en un seul exemplaire.

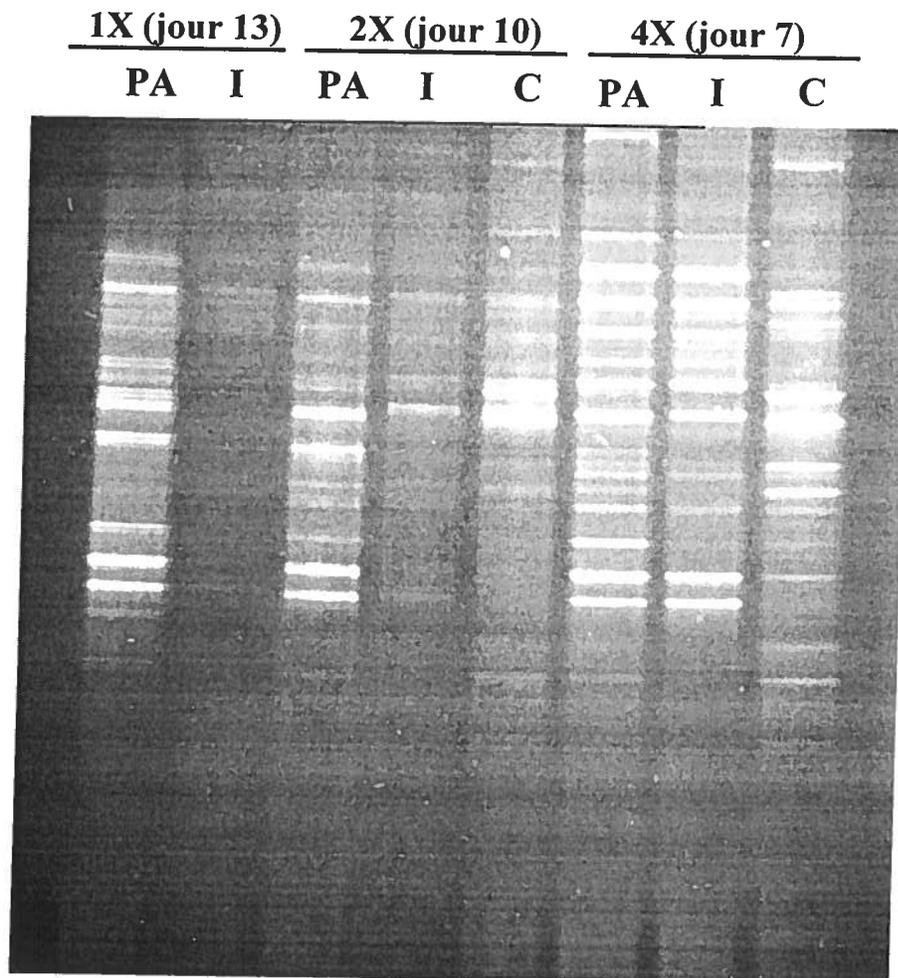


Figure 4.6. Profil de la diversité bactérienne dégradant le CHY dans la culture de départ (1X), la culture du premier repiquage (2X) et du 3^e repiquage (4X). L'ADN total a été extrait des différents échantillons prélevés et les gènes 16S ribosomiaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés par DGGE (gel d'acrylamide 8% avec un gradient dénaturant allant de 25% à 75%) et révélés par coloration au bromure d'éthidium.
 PA : phase aqueuse; I : interface; C : cerne

4.2 Détermination de la DCO de l'extrait de sol 10%

La DCO est une mesure indirecte de la charge organique d'un milieu. La DCO exprime la quantité d'oxygène nécessaire pour oxyder la matière organique, qu'elle soit biodégradable ou non, d'un milieu. Ce test a été effectué dans le but de déterminer la charge organique totale amenée par l'ajout d'extrait de sol 10% dans le système biphasique. Le dosage de la DCO a été effectué sur un échantillon d'extrait de sol 10% dilué 1 : 2. La D.O._{600nm} de l'échantillon d'extrait de sol 10% dilué a été de 0.2025. Une courbe standard a aussi été obtenue avec différentes dilutions de KHP (figure 4.7). Il a été possible de déterminer, à l'aide de l'équation de la courbe de tendance, que la DCO de l'extrait de sol 10% utilisé dans les systèmes biphasique, soit $506 \text{ mg/L} \times 2$, était donc de 1012 mg/L . L'extrait de sol 10% représente donc un ajout de charge organique dans les systèmes biphasiques et ainsi une source de carbone disponible aux microorganismes présents.

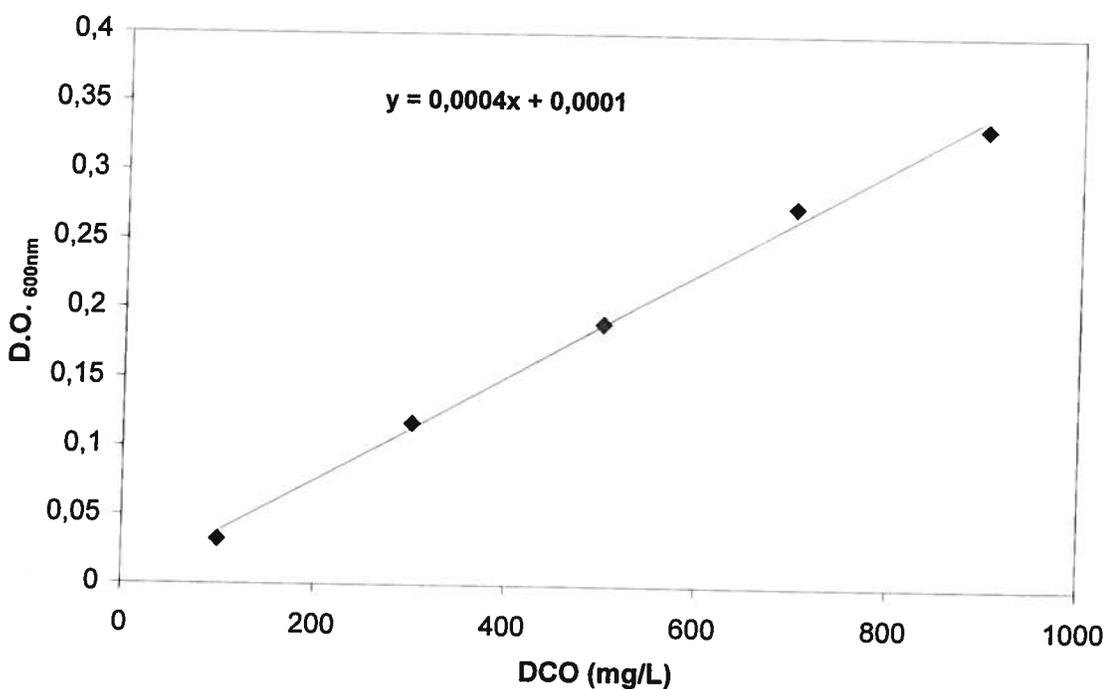


Figure 4.7. Courbe standard de la densité optique à 600nm obtenue à différentes concentrations d'acide phtalique de potassium (KHP). L'équation de la courbe de tendance a aussi été obtenue et indiquée sur la figure.

4.3 Caractérisation du consortium bactérien

Les profils de migration générés par PCR-DGGE dans les différentes expériences ont montré une diversité bactérienne assez importante du consortium. De façon à caractériser ce consortium, deux méthodes ont été utilisées soit la création d'une génothèque d'ADNr 16S et la culture sur gélose.

4.3.1 Identification des bactéries au moyen d'une génothèque d'ADNr 16S

L'échantillon d'ADN choisi pour le clonage avait déjà été vérifié sur DGGE (voir figure 4.2, phase aqueuse, jour 8). Cet échantillon avait démontré une bonne diversité bactérienne et les différentes bandes étaient présentes en concentration plutôt similaire. Les gènes ribosomiaux 16S de cet échantillon d'ADN ont donc été amplifiés par PCR. Les amplicons ont été clonés. Au total, 93 clones ont été vérifiés, 4 de ces clones se sont avérés être des faux-positifs et ont été écartés des expériences suivantes. Suite au criblage des clones, les inserts de 28 clones, présentant des profils différents, ont été envoyés au séquençage. À l'aide de différents programmes de détection des chimères, 4 séquences chimériques ont été rejetées. Les séquences nucléotidiques d'ADNr 16S de 24 clones, représentant 21 groupes de clones différents, ont été ajoutées à la banque de données « GenBank » sous les numéros d'accès allant de *DQ145559* à *DQ145582*. Pour permettre leur identification, les séquences d'ADNr 16S obtenues ont été ensuite comparées à celles présentes dans les banques de données.

Le tableau 4.1 présente les résultats d'identification des différents clones. Lorsque le pourcentage d'homologie était de 99% et plus, une identification jusqu'à l'espèce a été possible. Selon les comparaisons avec les banques de données, trois clones ont pu être identifiés jusqu'à l'espèce soient *Rhodanobacter lindaniclasticus* (IAFIL35), *Pigmentiphaga kullae* (IAFIL23) et *Sinorhizobium adhaerens* (IAFIL47, IAFIL54). Plusieurs séquences d'ADNr 16S ont aussi présenté une homologie de plus de 95%, ce qui a permis une affiliation des clones jusqu'au niveau du genre. Ainsi des clones appartenant aux genres *Achromobacter*, *Leifsonia*, *Bosea*, *Janthinobacterium*,

Paracoccus, *Sphingobium*, *Herbaspirillum*, *Caulobacter*, *Devosia*, *Afipia*, *Niabella*, *Sphingobacterium* et *Sphingomonas* ont pu être identifiés.

Suite à l'identification des clones, une comigration des clones et de l'échantillon de départ ayant servi à créer la génothèque a été effectuée sur DGGE. La figure 4.8 (voir p. 73) montre l'affiliation des différentes bandes du profil migratoire aux différents clones.

4.3.2 Identification bactérienne par extraction d'ADN sur gel de polyacrylamide

Après avoir procédé au criblage des clones obtenus, certaines bandes observées sur DGGE dans l'échantillon d'origine de la banque de clones n'avaient toujours pas été reliées à un clone particulier. La figure 4.8 montre d'ailleurs que les deux bandes supérieures (bandes **A** et **B**) du profil de migration n'ont pu être reliées à aucun clone de la génothèque. Ces deux bandes ont donc été excisées du gel et l'ADN de chaque échantillon a été réamplifié pour être envoyé au séquençage. La séquence de la bande **A** a présenté une homologie de 99% avec une séquence de *Sphingobacterium multivorum* (AB100739) sur une longueur de 140 nucléotides. La séquence de la bande **B** a présenté une homologie de 92% avec une séquence de *Sphingobacterium* sp. (DQ530166) sur une longueur de 131 nucléotides. Il est donc possible d'affilier les deux bandes excisées à l'embranchement des Bacteroidetes.

Tableau 4.1. Résultats d'identification des clones présents dans la génothèque d'ADNr 16S. Le criblage des clones a permis de former 21 groupes distincts et des clones représentatifs ont été séquencés puis comparés aux banques de données.

Clone représentatif	Nombre de clones	Identification (blastn)	Homologie %	Longueur de la séquence (blastn) (nt)
IAFIL7 DQ145559	13	<i>Achromobacter denitrificans</i> Y14907	98	895
IAFIL85 DQ145580				1014
IAFIL8 DQ145560	2	<i>Leifsonia xyli</i>	98	984
IAFIL11 DQ145561	6	<i>Rhodanobacter lindaniclasticus</i> AB245365	91	713
IAFIL35 DQ145582			99	1080
IAFIL13 DQ145562	1	<i>Bosea thiooxidans</i> AF508803	98	957
IAFIL23 DQ145563	15	<i>Pigmentiphaga kullae</i> AF282916	99	1003
IAFIL26 DQ145564	1	<i>Janthinobacterium</i> sp. AB196254	98	872
IAFIL32 DQ145565	2	<i>Paracoccus aminovorans</i> D32240	98	1045
IAFIL33 DQ145566	2	Gemmatimonadetes non cultivé AY921994	96	897
IAFIL46 DQ145567	7	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> AY047219	95	963
IAFIL47 DQ145568	13	<i>Sinorhizobium adhaerens</i> AY040360	99	986
IAFIL54 DQ145570				1028
IAFIL50 DQ145569	1	Betaprotéobactérie AB008505	99	1021
		<i>Herbaspirillum autotrophicum</i> AB074524	97	1000

Les numéros d'accès à la banque de données GenBank sont donnés sous le nom des clones et des espèces.

Tableau 4.1 (suite). Résultats d'identification des clones présents dans la génothèque d'ADNr 16S.

Clone représentatif	Nombre de clones	Identification (blastn)	Homologie %	Longueur de la séquence (blastn) (nt)
IAFIL56 DQ145571	1	<i>Caulobacter</i> sp. AJ227774	96	968
IAFIL59 DQ145572	3	<i>Devosia</i> sp. AY779531	95	835
IAFIL62 DQ145573	1	Planctomycete non cultivé AJ616270	92	752
IAFIL65 DQ145574	1	<i>Afipia</i> genosp. U87785	99	999
IAFIL77 DQ145575	1	<i>Niabilella koreensis</i> DQ457019	97	944
IAFIL79 DQ145576	1	<i>Sphingobacterium</i> sp. DQ530064	99	965
		<i>Sphingobacterium multivorum</i> AY787820	96	984
IAFIL81 DQ145577	3	<i>Sphingomonas</i> sp. DQ337575	99	989
IAFIL83 DQ145578	2	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> AB120764	94	878
IAFIL84 DQ145579	4	<i>Janthinobacterium</i> sp. AB196254	99	1017
IAFIL91 DQ145581	2	<i>Caulobacter leidyi</i> AF331660	97	985

Les numéros d'accès à la banque de données GenBank sont donnés sous le nom des clones et des espèces.

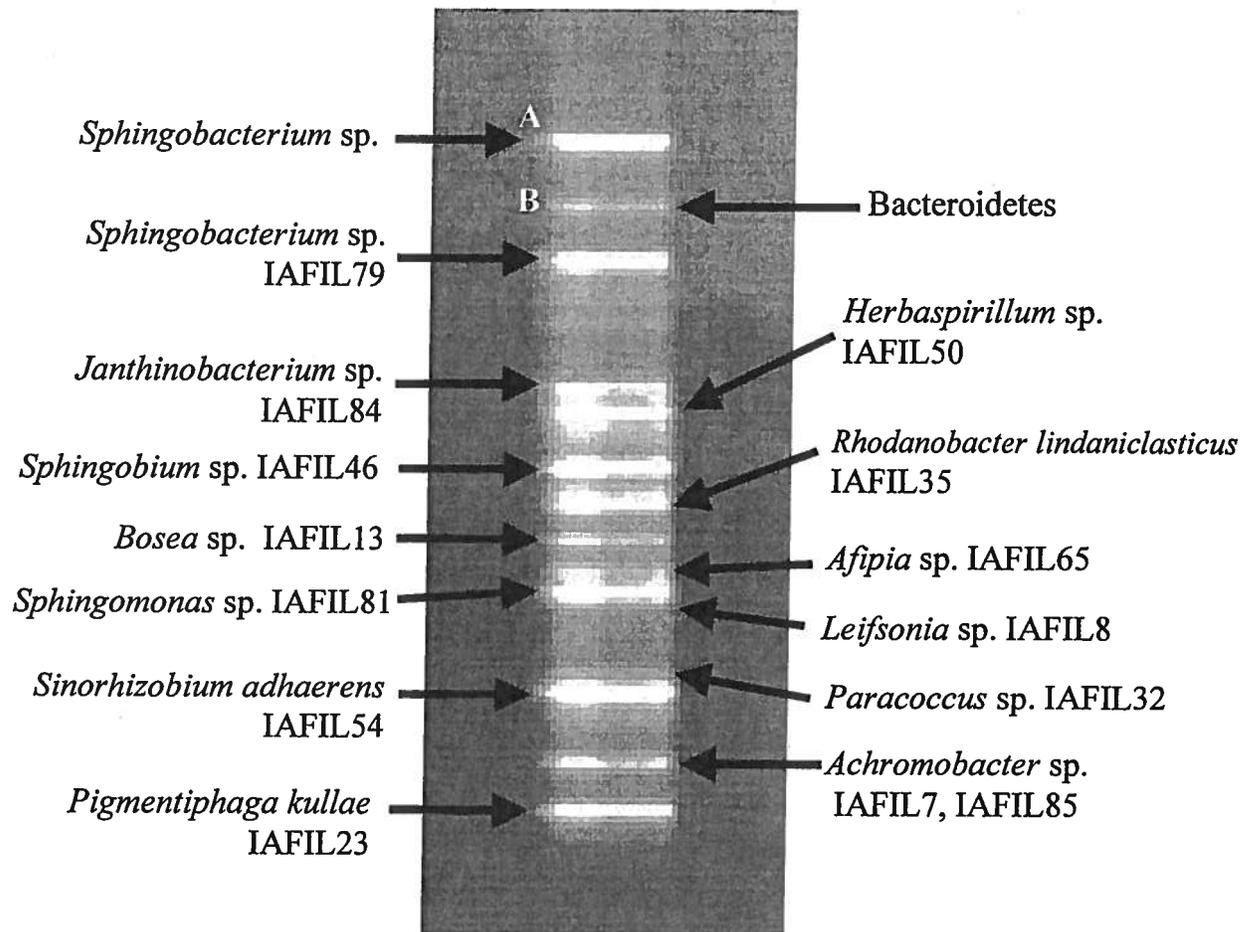


Figure 4.8. Association des bandes observées sur DGGE aux clones identifiés par séquençage de leur ADNr 16S. Suite à la comigration des amplicons (segments d'ADNr 16S amplifiés par PCR) des différents clones identifiés et de l'échantillon ayant servi à faire la génothèque, l'affiliation des bandes à un clone particulier a pu être effectuée. Les gènes 16S ribosomiaux ont été séparés par DGGE (gel d'acrylamide 8% avec un gradient dénaturant allant de 30% à 70%) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. Les bandes A et B ont été identifiées suite au séquençage de l'ADN extrait de chacune des bandes.

4.3.3 Caractérisation de bactéries du consortium par la culture sur gélose

Différentes dilutions d'un échantillon de la phase aqueuse du système biphasique ont été étalées sur des géloses R2A. Les colonies présentant des morphologies distinctes ont été repiquées et l'ADN en a été extrait dans le but d'amplifier l'ADNr 16S et de les séquencer. Les séquences de 11 souches ont donc été comparées avec celles présentes dans les banques de données. Le tableau 4.2 présente les résultats d'identification des différentes souches. Puisqu'elles démontraient une homologie de 99% et plus, une identification jusqu'à l'espèce a été possible pour 3 souches (S2, S7 et S8) qui ont été affiliées à *Nocardioides simplex*, *Achromobacter denitrificans* et *Shinella zoogloeoides*. Pour toutes les autres souches, une identification jusqu'au genre a été possible. Les genres bactériens retrouvés par la méthode de culture sur gélose ont été les suivants : *Sinorhizobium*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Novosphingobium*, *Mesorhizobium* et *Bosea*. Les genres *Achromobacter*, *Sinorhizobium* et *Bosea* sont des genres qui ont aussi été retrouvés dans la génothèque (section 4.3.1).

De façon à caractériser davantage ces 11 souches, des tests de vaporisation de HAP sur géloses et le test de l'indole ont été effectués. Les tests de vaporisation de HAP sur gélose ont permis de repérer les souches aptes à dégrader le HAP vaporisé. Quant au test de l'indole, il a permis de détecter si les souches testées exprimaient une dioxygénase capable de lier l'indole dans son site actif et de le transformer en indigo, telle la NAP dioxygénase, et qui pourrait donc être impliquée dans le clivage de cycles aromatiques. Deux souches témoins ont aussi été utilisées soient *Pseudomonas aeruginosa* 57 et *Sphingomonas* sp. 107-6 (Dagher *et al.*, 1997). Pour les tests de vaporisation, quatre HAP ont été testés soient le NAP, le PHE, le PYR et le CHY. Ces vaporisations ont été effectuées sur des milieux de culture R2A, BHY (milieu BH avec extrait de levure) et BHY avec du salicylate de sodium (BHYS). Le tableau 4.3 présente les résultats obtenus. La vaporisation du NAP sur les souches S2, S3, S4, S5 et S9 ont conduit à la formation de zones claires autour des colonies ce qui montre leur potentiel à dégrader le NAP. Pour ce qui est du PHE et du PYR, seule la souche S9 a démontré un potentiel à dégrader ces deux HAP par la formation de zones claires de dégradation et/ou par l'apparition d'un pigment jaune-brun. Aucune des souches n'a toutefois démontré un potentiel à dégrader

le CHY dans les conditions utilisées pour ces tests de vaporisation. De plus, aucune souche n'a donné de résultat positif au test de l'indole, c'est à dire qu'aucun pigment bleu, provenant de la transformation de l'indole en indigo, n'a été observé.

Tableau 4.2. Résultats d'identification des souches isolées lors de la culture sur gélose. L'ADN de chaque souche a été extrait, une amplification de l'ADNr 16S a été effectuée et les échantillons ont été séquencés et comparés aux banques de données.

Souche	Identification (blastn)	Homologie (%)	Longueur de la séquence (blastn) (nt)
S1	<i>Sinorhizobium adhaerens</i> AY040360	98	1132
S2	<i>Nocardioides simplex</i> AY509240	99	732
S3	<i>Micrococcus luteus</i> AJ717368	98	845
S4	<i>Chryseobacterium joostei</i> AJ271010	96	793
S5	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DQ346728	98	756
S6	<i>Bacillus benzoovorans</i> AY043085	98	1100
S7	<i>Achromobacter denitrificans</i> AJ278451	99	1092
S8	<i>Shinella zoogloeoides</i> X74915	99	907
S9	Alpha-protéobactérie non cultivée AJ311962	98	1084
	<i>Novosphingobium pentaromativorans</i> AF502400	96	1066
S10	<i>Mesorhizobium amorphae</i> AY491077	97	1076
S12	<i>Bosea thiooxidans</i> AF508803	98	1100

Les numéros d'accès à la banque de données GenBank sont donnés sous le nom des espèces.

Tableau 4.3. Caractérisation des souches isolées du consortium étudié et de deux souches témoins par rapport aux tests de vaporisation de HAP sur gélose et au test de l'indole.

Souche	NAP			PHE			PYR			CHY			Test de l'indole
	R2A	BHY	BHYS										
S1	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S2	-	nd	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3	+	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S4	+	nd	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S5	+	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S6	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S8	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S9	+	nd	+	+	+	+ P	-	P	P	-	-	-	-
S10	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S12	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA57	+ P	nd	P	+ P	+ P	+ P	-	-	-	-	-	-	+
S107-6	+ P	nd	+	+	+	+	P	+ P	P	-	-	-	nd

+ : formation d'une zone claire (halo)

P : production d'un pigment jaune-brun

- : résultat négatif

nd: résultat non déterminé

BHYS: milieu BHY additionné de salicylate (100 mg/L)

Souches témoins: *Pseudomonas aeruginosa* 57 et *Sphingomonas* sp. 107-6

4.3.4 Étude phylogénétique des bactéries identifiées dans le consortium bactérien

Une étude phylogénétique a été effectuée à partir des séquences d'ADNr 16S de 12 clones et de 3 souches provenant du consortium étudié. Cette étude a permis de générer trois arbres consensus présentés aux figures 4.9, 4.10 et 4.11. Cette classification phylogénétique a été utile pour confirmer ou faciliter l'affiliation des clones aux espèces bactériennes les plus proches principalement pour ceux dont le pourcentage d'homologie avec les séquences d'ADNr 16S des banques de données était plus faible par exemple moins de 98% d'homologie.

Dans la génothèque d'ADNr 16S, 42.7% des clones se sont apparentés aux alphaprotéobactéries et 41.5% des clones aux betaprotéobactéries. Au niveau de la diversité par contre, 10 groupes de clones différents ont représenté les alphaprotéobactéries et 6 groupes de clones pour les betaprotéobactéries. Pour ce qui est des souches, 5 des 11 souches (S1, S8, S9, S10 et S12) ont été affiliées aux alphaprotéobactéries. La figure 4.9 représente d'ailleurs la classification phylogénétique de quelques souches et clones de la génothèque affiliés aux alphaprotéobactéries. La figure 4.9 a permis de confirmer par exemple que le clone IAFIL56 est bien affilié au genre *Caulobacter* et se rapproche davantage de l'espèce *C. fusiformis*. De plus, le clone IAFIL59 est bien affilié au genre *Devosia* et s'apparente à l'espèce *D. euplotis*.

Les betaprotéobactéries ont été représentées par deux principaux groupes de clones soient le groupe représenté par les clones IAFIL7 et IAFIL85 et le groupe représenté par le clone IAFIL23. En effet, le groupe comprenant IAFIL7 et IAFIL85, affilié à *Achromobacter denitrificans*, a compté pour 38% des betaprotéobactéries présentes dans la génothèque et le groupe présenté par le clone IAFIL26, affilié à *Pigmentiphaga kullae*, a représenté 44% des betaprotéobactéries. Une seule souche (souche S7) a aussi été affiliée à *A. denitrificans*. La figure 4.10 représente la classification phylogénétique des betaprotéobactéries sur laquelle il est possible d'observer l'affiliation de trois autres clones de la génothèque. D'ailleurs, le clone

IAFIL50 a pu être confirmé comme appartenant au genre *Herbaspirillum* et serait affilié plus particulièrement à l'espèce *H. autotrophicum*.

Les autres groupes de clones ont été apparentés à différentes classes soient aux classes des gammaprotéobactéries (7.3% des clones de la génothèque ; IAFIL11 et IAFIL35), des actinobacteria (IAFIL8 ; souches S2, S3 et S5), des bacilli (souche S6), des gemmatimonadetes (IAFIL33), des planctomycetacia (IAFIL62), des bacteroidetes (IAFIL79) et des flavobactéries (IAFIL77 ; souche S4). Les classes des bacteroidetes et des flavobactéries font partie de l'embranchement des Bacteroidetes aussi nommé groupe CFB (Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides). La classification phylogénétique du groupe CFB a d'ailleurs été représentée à la figure 4.11.

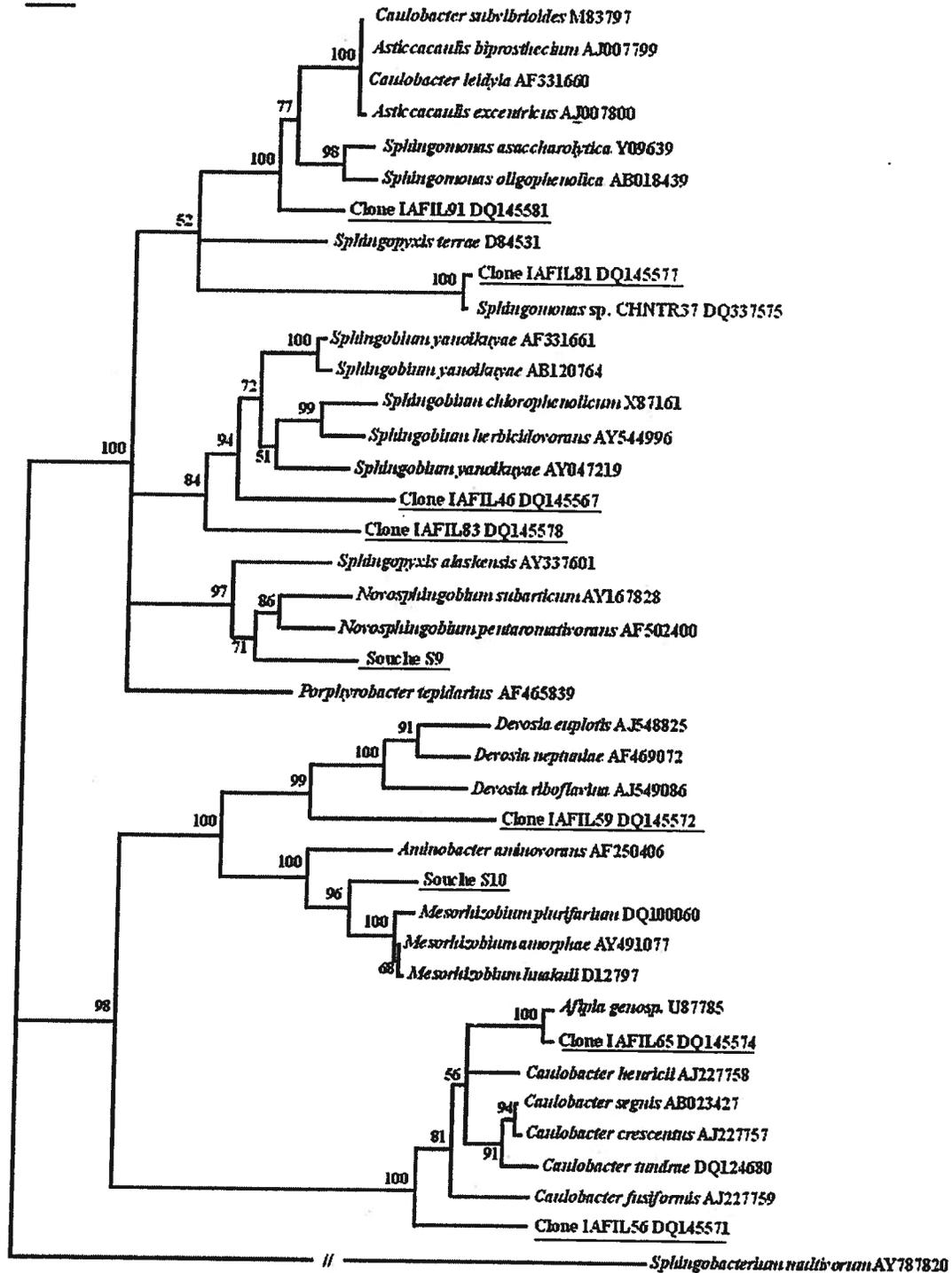


Figure 4.9. Classification phylogénétique des alphaprotéobactéries. Arbre consensus non enraciné (*Sphingobacterium multivorum* à titre d'extragroupe) montrant la position de certains clones de la génothèque d'ADNr 16S et de souches isolées du consortium. Les nombres affichés aux nœuds représentent les pourcentages (>50%) obtenus suite à une analyse « bootstrap » qui supporte l'analyse des distances. La barre de distance représente 0.01 substitution par position.

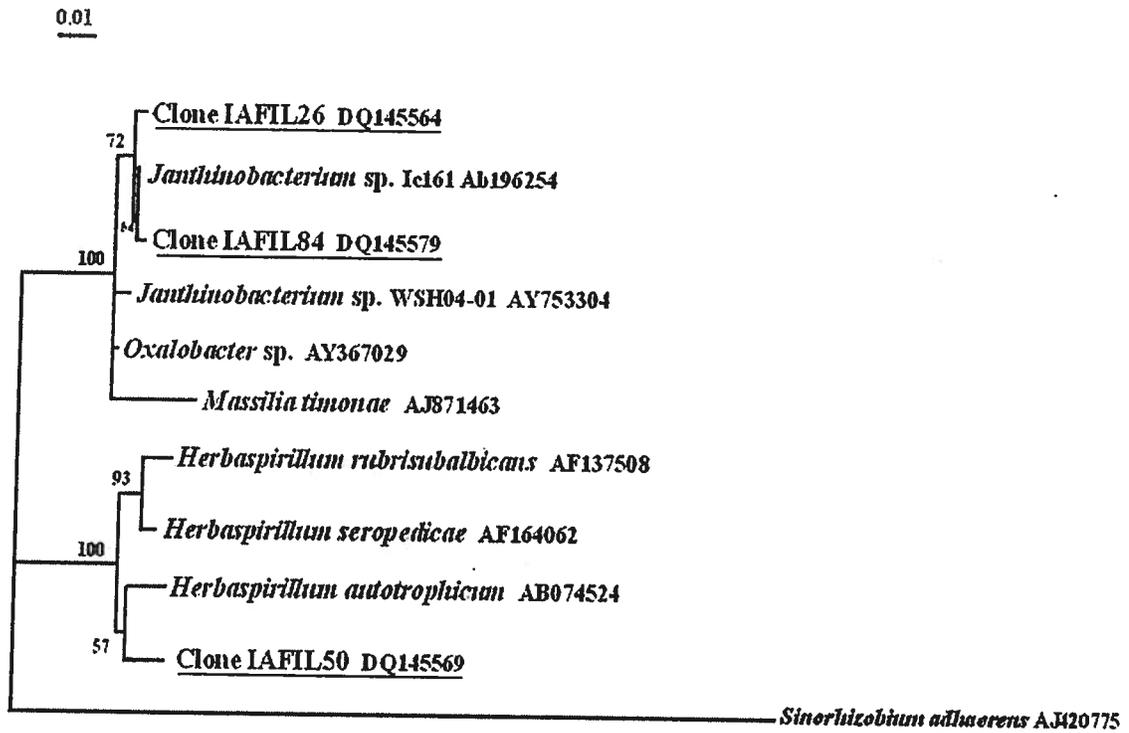


Figure 4.10. Classification phylogénétique des betaprotéobactéries. Arbre consensus non enraciné (*Sinorhizobium adhaerens* à titre d'extragroupe) montrant la position de certains clones de la génothèque d'ADNr 16S. Les nombres affichés aux nœuds représentent les pourcentages (>50%) obtenus suite à une analyse « bootstrap » qui supporte l'analyse des distances. La barre de distance représente 0.01 substitution par position.

0.01

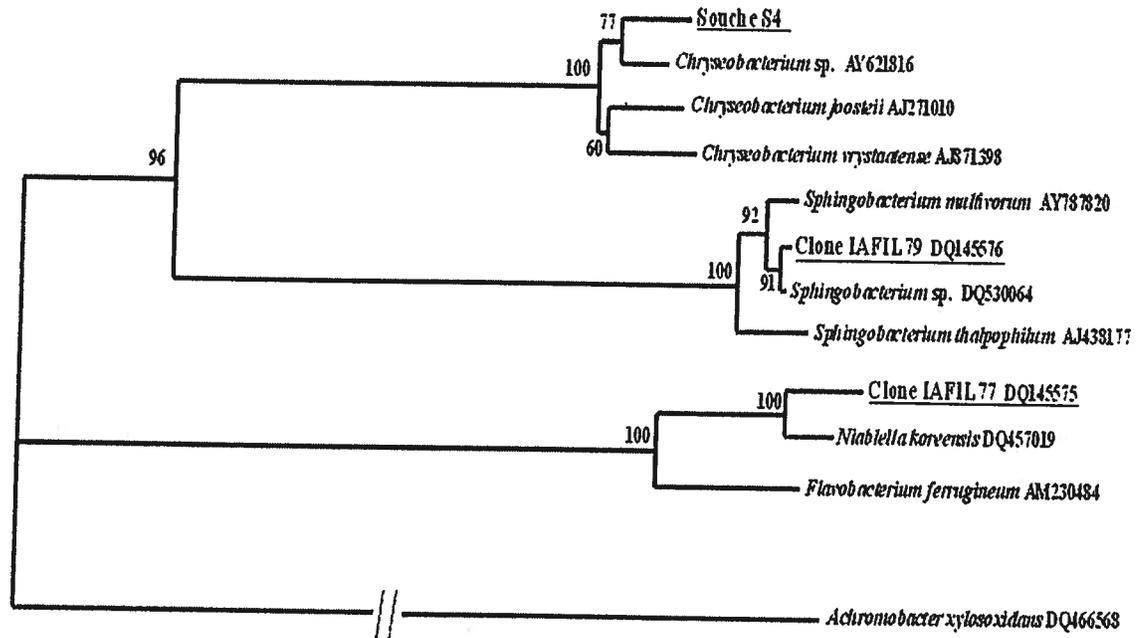


Figure 4.11. Classification phylogénétique des Bacteroidetes. Arbre consensus non enraciné (*Achromobacter xylosoxidans* à titre d'extragroupe) montrant la position de certains clones de la génothèque d'ADNr 16S et d'une souche isolée du consortium. Les nombres affichés aux nœuds représentent les pourcentages (>50%) obtenus suite à une analyse « bootstrap » qui supporte l'analyse des distances. La barre de distance représente 0.01 substitution par position.

4.4 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM et la diversité bactérienne présente dans les systèmes biphasiques

4.4.1 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM

Une expérience a été effectuée dans le but de déterminer si l'ajout de HAP de faible poids moléculaire (HAP FPM) comme le NAP et le PHE pouvait avoir un effet sur la dégradation des HAP de haut poids moléculaire (HAP HPM). Des systèmes biphasiques avec du PYR, CHY et BAP ont été préparés et du NAP ou du PHE a été ajouté. Un système biphasique sans ajout de HAP FPM et un témoin abiotique ont aussi été préparés. La dégradation des HAP HPM présents dans les systèmes biphasiques a été suivie par HPLC durant 33 jours. La figure 4.12 montre les cinétiques de dégradation du PYR, du CHY et du BAP dans ces systèmes.

Tout le PYR a été dégradé en 6 jours dans les cultures contrôles (fliales normales) et dans celles contenant l'ajout de NAP. Dans les cultures additionnées de PHE, la dégradation complète du PYR a été observée après 12 jours d'incubation. En ce qui concerne le CHY, les cultures contenant du NAP ont montré une dégradation complète du CHY après 6 jours tandis que dans les cultures contenant du PHE, la dégradation complète a été observée après 12 jours. Après 12 jours, 97% du CHY avait été dégradé dans les cultures ne contenant aucun additif, la dégradation complète du CHY a été notée après 15 jours dans ces cultures. Après 33 jours d'incubation, 45% du BAP avait été dégradé dans les cultures additionnées de PHE tandis que dans les cultures additionnées de NAP, une baisse de 30% du BAP a été observée. Pour ce qui est des cultures biphasiques sans additif, une faible dégradation de 6% a été notée. Dans toutes ces expériences, les témoins abiotiques n'ont démontré aucune perte substantielle.

4.4.2 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la diversité bactérienne

Afin de vérifier si l'ajout de HAP FPM a affecté la diversité bactérienne du consortium étudié, des échantillons ont été prélevés dans les différents systèmes biphasiques aux jours 0, 13 et 34 à différents endroits soient dans la phase aqueuse, le cerne ou à l'interface. Suite à l'extraction d'ADN total de ces échantillons et à l'amplification des ADNr 16S, des profils de diversité ont été obtenus par la technique du

DGGE (voir figure 4.13). L'échantillon du jour 0 représente la diversité de l'inoculum qu'a reçu chacune des fioles de cette expérience au départ. Cet échantillon de départ a confirmé avoir une bonne diversité bactérienne sans pour autant démontrer de bandes qui ressortaient vraiment plus que d'autres sur le gel de polyacrylamide. Dans les échantillons provenant des cultures contrôles (sans additif), une diversité assez importante a été présente durant les 34 jours de l'expérience tant dans la phase aqueuse que sur le cerne. Par contre, les profils de diversité présents dans les échantillons de la phase aqueuse n'ont pas été les mêmes que les profils des cernes pour les cultures contrôles. Aucun échantillon de la l'interface n'a été analysé sur DGGE pour les cultures contrôles. L'ajout de PHE dans les cultures a amené un changement dans les profils de diversité comparé à la culture contrôle et à l'échantillon de départ. En effet, une bande s'est démarquée dans les échantillons de phase aqueuse tandis que 3 bandes ont été particulièrement accentuées dans les échantillons provenant du cerne. De plus, l'échantillon provenant de l'interface au jour 34 de la culture avec PHE a montré le même profil DGGE (résultat non présenté à la figure 4.13) que celui provenant de l'échantillon de phase aqueuse au jour 34, c'est à dire une bande très prononcée. Les profils associés aux cultures additionnées de NAP ont démontré une bande très importante dès le jour 13 et ce autant dans les échantillons de la phase aqueuse, de l'interface et du cerne.

L'identification bactérienne liée aux 3 bandes les plus importantes sur la figure 4.13 a été effectuée par comigration sur DGGE de clones préalablement séquencés (voir section 4.3), des souches isolées et des échantillons à identifier. Aussi, le séquençage d'un échantillon provenant des cultures avec du NAP (jour 13, phase aqueuse) a été effectué. La comigration sur DGGE a permis de déterminer que la bande supérieure (**B** sur la figure 4.13) était liée à une bactérie de l'embranchement des Bacteroidetes et que la bande inférieure (**A**) correspondait au clone IAFIL7 et à la souche S7 soit *Achromobacter denitrificans*. Par comigration, la bande S a semblé migré près du clone IAFIL46 et l'association de la bande S à *Sphingobium yanoikuyae* a été confirmée par le séquençage du produit de PCR de l'échantillon (NAP, Jour 13, PA). Suite à la comparaison de la séquence avec les banques de données, l'homologie a été de 100% avec *S. yanoikuyae* (AY047219) sur une longueur de 107 nucléotides.

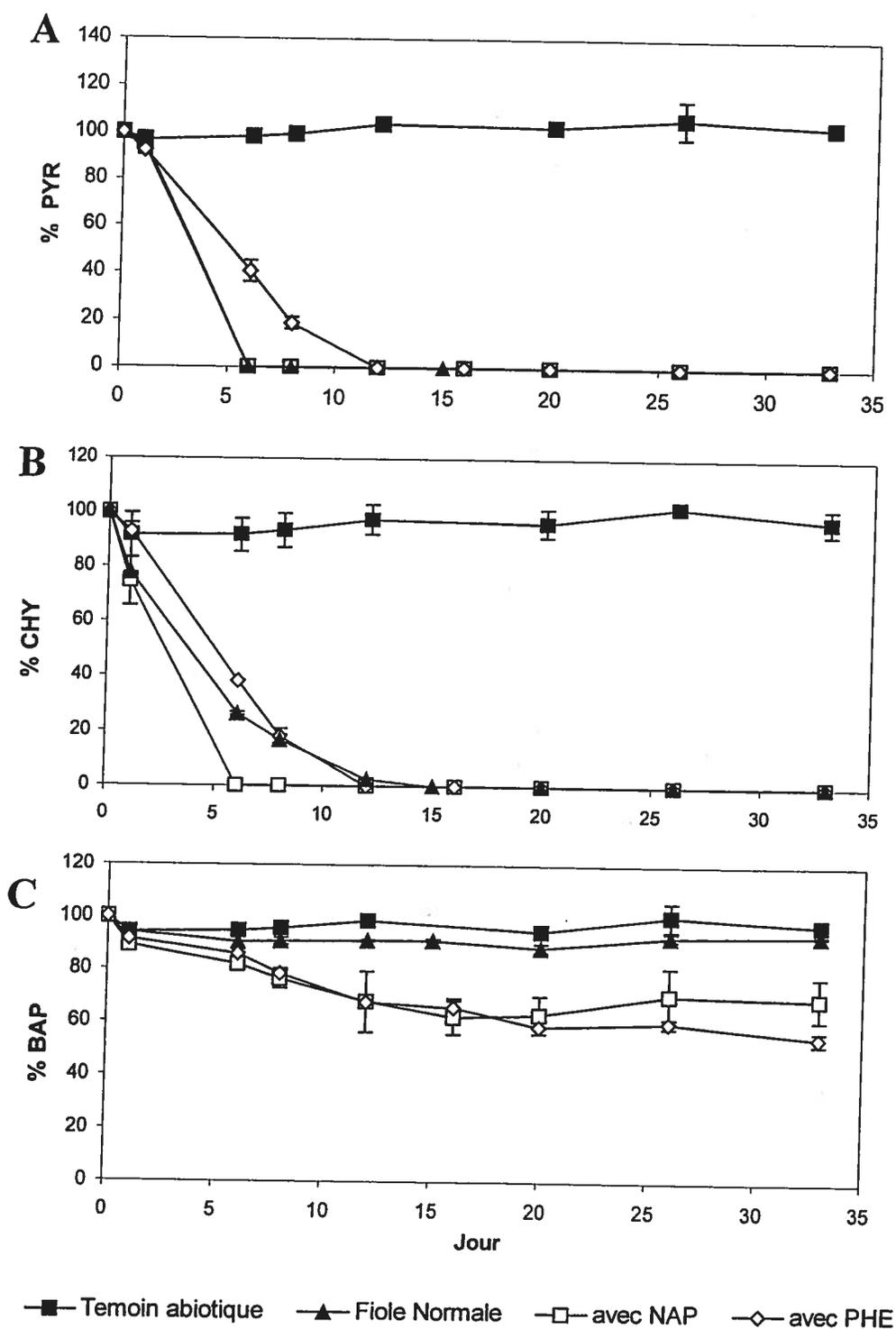


Figure 4.12. Effet de l'ajout de HAP FPM, tels le NAP et le PHE, sur la dégradation du PYR (A), du CHY (B) et du BAP (C) dans les systèmes biphasiques. La concentration initiale des HAP HPM était de 141 mg/L de PYR, 44 mg/L de CHY et 125 mg/L de BAP. Ces tests ont été effectués en duplicata.

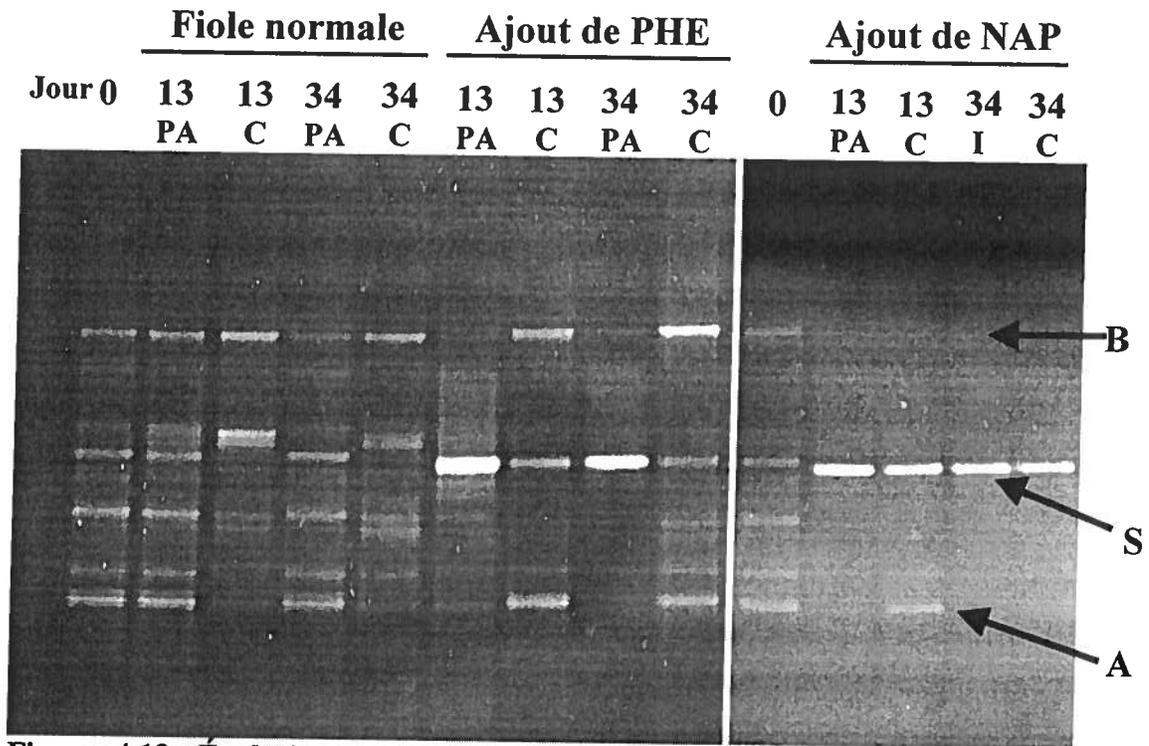


Figure 4.13. Évolution de la diversité bactérienne présente dans les systèmes biphasiques suite à l'ajout de NAP et de PHE. Des échantillons ont été prélevés aux jours 0, 13 et 34. L'ADN total a été extrait des échantillons et les gènes 16S ribosomaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés par DGGE (gel d'acrylamide 8% avec un gradient dénaturant allant de 30% à 70%) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. PA : phase aqueuse; I : interface; C : cerne
 La comigration sur DGGE et le séquençage a permis d'identifier trois bandes sur cette figure. B : Bacteroidetes; S : *Sphingobium* sp.; A : *Achromobacter* sp.

4.5 Détection de gènes de dégradation de produits aromatiques

La détection de certains gènes de dégradation de produits aromatiques a été effectuée sur les souches identifiées (section 4.3.3), sur une des souches isolées (*Mycobacterium gilvum* B1) lors d'une autre étude sur ce consortium (Gauthier *et al.*, 2003) ainsi que sur l'ADN total extrait d'un échantillon du consortium étudié. Neuf paires d'amorces différentes ont été testées lors de cette expérience. Des souches contrôles ont aussi été utilisées soient la souche *Pseudomonas aeruginosa* 57 pour les paires d'amorces ciblant *nahAc* et *xyIE* (tout) et *Sphingomonas* sp. 107-6 pour la présence des gènes *xyIE* (Sphingo) (c'est-à-dire les gènes *xyIE* qui ont été retrouvés chez des bactéries du genre *Sphingomonas* dans les banques de données) et *bphC2* (Sphingo). De plus, la souche *M. gilvum* B1 (Gauthier *et al.*, 2003) a servi de contrôle positif pour la détection du gène *nidA*.

Les résultats de détection et d'identification des différents gènes sont présentés dans le tableau 4.4. Deux gènes ont été retrouvés chez la souche S9 (affiliée à *Novosphingobium* sp.) soient les gènes *xyIE* et *bphC*. Le séquençage a permis de confirmer, pour le gène *xyIE*, une homologie de la séquence en acides nucléiques (a.n.) de 86% (sur un segment de 460 nucléotides) à une enzyme de type catéchol dioxygénase chez *Sphingomonas paucimobilis* et une homologie de 87% à la séquence en acides aminés (a.a.) d'une catéchol 2,3-dioxygénase chez *Novosphingobium aromaticivorans* (sur un segment de 158 a.a.). Le séquençage du gène *bphC* a permis de confirmer une homologie de 85% en a.n. (sur un segment de 449 nucléotides) à une 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase chez *S. yanoikuyae* et une homologie de 68% en a.a. (sur un segment de 224 a.a.) à une dihydroxy naphthylène/biphényle dioxygénase retrouvée chez *N. aromaticivorans*. Chez les autres souches identifiées à la section 4.3.3, aucun autre gène n'a été amplifié à partir des amorces utilisées. Chez la souche *M. gilvum* B1, le gène *nidA* a été amplifié et sa présence a été confirmée par le séquençage. En effet, la séquence a eu une homologie de 99% avec une séquence codant pour une sous-unité α d'une dioxygénase chez *Mycobacterium flavescens*. Pour ce qui est de la détection des gènes à partir de l'ADN total du consortium, seuls les trois mêmes gènes ont été amplifiés. En effet, *xyIE*, *nidA* et *bphC* ont été détectés. Le séquençage des produits de

PCR a permis de confirmer une homologie de 99% avec la séquence d'une catéchol 2,3-dioxygénase chez *Sphingomonas* sp. pour l'amplification du gène *xyIE*, une homologie de 97% avec une sous-unité α d'une dioxygénase chez *M. gilvum* pour le gène *nidA* et finalement une homologie de 100% avec une extradiol dioxygénase chez une souche de *Sphingomonas* sp.

Tableau 4.4. Détection et identification de certains gènes de dégradation de composés aromatiques chez certaines souches et dans le consortium ainsi que leur homologie en acides nucléiques et/ou en acides aminés.

Gène ciblé	Détection chez les souches	Identification par séquençage	Homologie (% a.n.)	Homologie (% a.a.)	Détection dans le consortium	Identification par séquençage	Homologie (% a.n.)
<i>nahAc</i>	Non	—	—	—	Non	—	—
<i>xyIE</i> (tout)	Non	—	—	—	Non	—	—
<i>xyIE</i> (Sphingo)	Oui (Souche S9)	Catéchol dioxygénase AB035678.1	86	—	Oui	Catéchol 2,3-dioxygénase Z84817	99
		Catéchol 2,3-dioxygénase AAD03998	—	87			
<i>nidA</i>	Oui (<i>M. gilvum</i> B1)	Dioxygénase sous-unité α (<i>nidA</i>) AF548343	99	—	Oui	Dioxygénase sous-unité α (<i>nidA</i>) AF548347	97
<i>phnAc</i>	Non	—	—	—	Non	—	—
<i>bphC</i> (Pseudo)	Non	—	—	—	Non	—	—
<i>bphC</i> (Sphingo)	Oui (S9)	2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase (<i>bphC</i>) U23374	85	—	Oui	Extradiol dioxygénase AJ633552	100
		dihydroxy naphthalène/biphényle dioxygénase AAD04006	—	68			
<i>todC</i> (Pseudo)	Non	—	—	—	Non	—	—
<i>todC</i> (tout)	Non	—	—	—	Non	—	—

Les numéros d'accès à la banque de données GenBank sont donnés sous le nom des enzymes.

4.6 Étude de la capacité de dégradation des souches caractérisées

4.6.1 Étude de la dégradation et de la diversité d'un consortium reconstitué

Cette expérience avait pour but de vérifier l'efficacité de dégradation d'un nouveau consortium constitué exclusivement des 11 souches isolées sur géloses R2A (voir section 4.3.3) comparé à l'efficacité de la souche S9 seulement. Trois systèmes biphasiques différents avec du PYR, du CHY et du BAP ont été constitués en duplicata avec trois différents inoculum soit un mélange des 11 souches, toutes les souches sauf la souche S9 ou la souche S9 seule. Tous les systèmes biphasiques ont été mis en agitation et incubés durant 26 jours. Les cinétiques de dégradation du PYR et du CHY sont présentées à la figure 4.14. Il est à noter qu'une courbe de dégradation a été tracée pour chacune des deux cultures contenant toutes les souches sauf la souche S9 (11 sauf S9_A et 11 sauf S9_B) et présentée à la figure 4.14, pour ces cultures ce n'est donc pas la moyenne des données du duplicata qui a été retenue comme pour les autres courbes.

Dans la culture contenant les 11 souches comme inoculum, 42% du PYR a été dégradé en 26 jours et 31% du PYR a été dégradé dans les fioles n'ayant reçu que la souche S9 comme inoculum. Une des cultures contenant toutes les souches sauf la souche S9 (11 sauf S9_B) s'est comportée comme le témoin abiotique ne montrant aucune dégradation du PYR. Pour ce qui est de l'autre culture ayant reçu comme inoculum toutes les souches sauf S9 (11 sauf S9_A), après une période de latence de 12 jours, une dégradation de plus de 39% a été observée jusqu'à la fin de l'expérience.

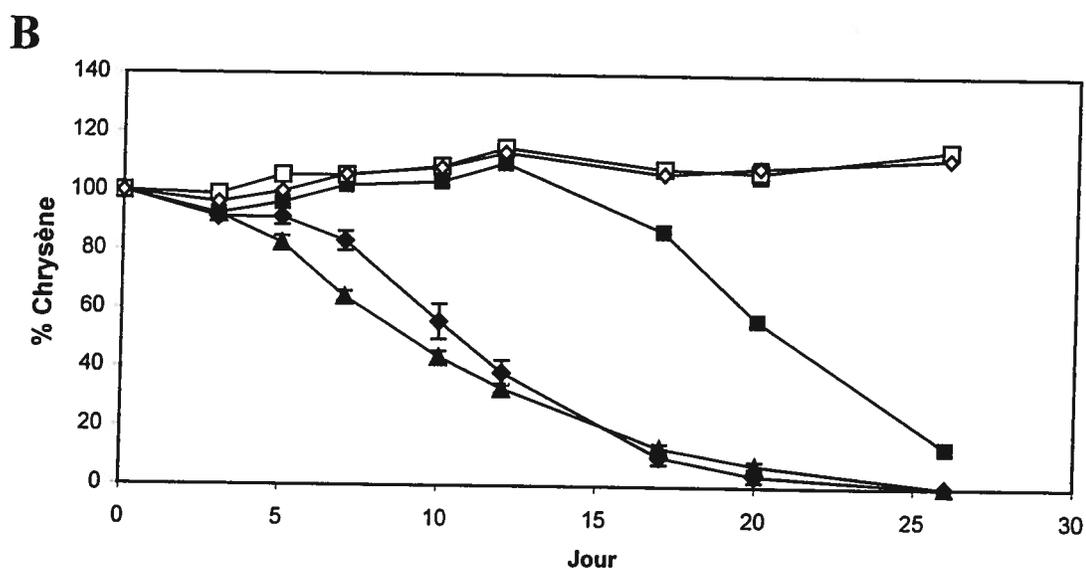
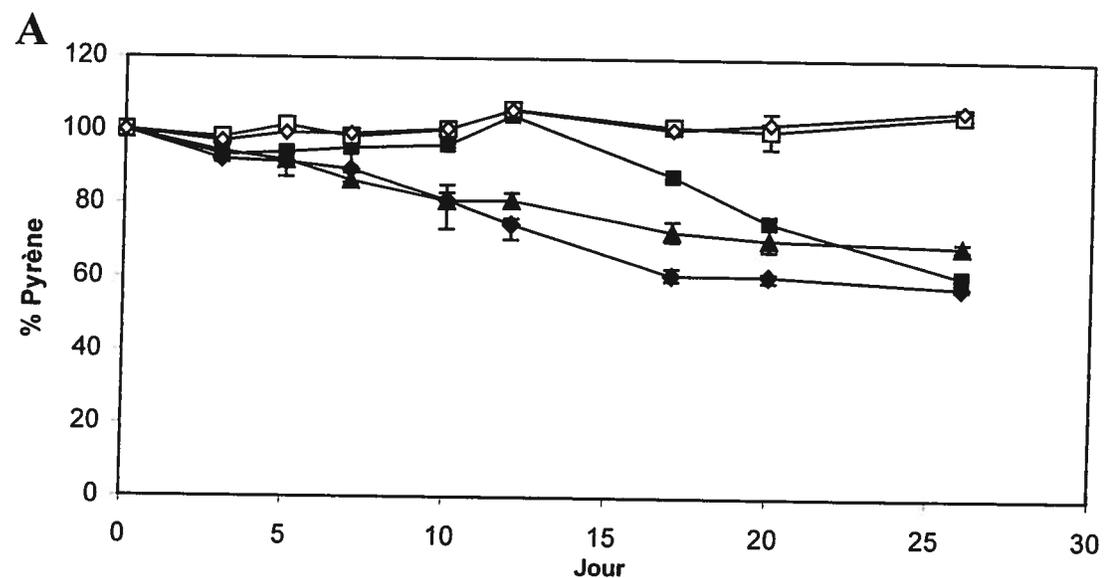
La dégradation du CHY s'est produite plus rapidement et a été plus efficace que celle du PYR. En effet, 100% du CHY a été dégradé en 26 jours dans les cultures ayant les 11 souches comme inoculum et celles n'ayant que la souche S9. Quant à la culture identifiée comme « 11 sauf S9_B », aucune dégradation du CHY n'a été observée tandis que la culture « 11 sauf S9_A » a montré une dégradation de 86% du CHY en 26 jours, encore une fois après une période de latence d'environ 12 jours. Pour ce qui est du BAP,

dans aucun des systèmes biphasiques une dégradation substantielle de cet HAP n'a été observée.

De façon à observer la diversité présente dans les différents systèmes biphasiques étudiés après 27 jours d'incubation, des échantillons ont été pris dans la phase aqueuse. L'ADN de ces échantillons a été extrait et le profil migratoire des ADN ribosomiaux 16S a été déterminé par DGGE. La figure 4.15 montre ces profils de diversité. Il est possible d'observer sur les profils de diversité des cultures inoculées avec les 11 souches (colonnes 2 et 3) la perte de certaines bandes sur le DGGE comparé à la colonne 1 qui représente le mélange des 11 souches de départ. Les profils migratoires des cultures contenant toutes les souches sauf la souche S9 (11 sauf S9_A et 11 sauf S9_B) sont différents après 27 jours d'incubation. En fait, la bande correspondant à la souche S9 est bien présente dans le profil de diversité de la culture « 11 sauf S9_A ». Comme cette souche S9 ne faisait pas partie de l'inoculum de départ de cette souche, il est donc possible de penser que cette fiole a été contaminée durant l'expérience. Pour ce qui est des profils de diversité des cultures contenant seulement la souche S9, les colonnes 6 et 7 présentent bel et bien la bande correspondante. Les autres bandes plus pâles dans les colonnes 6 et 7 sont possiblement dues à une faible contamination amplifiée par PCR.

4.6.2 Étude de la dégradation des HAP HPM chez la souche S9

Cette expérience avait pour but de vérifier si la dégradation des HAP effectuée par la souche S9 était ou non une réaction de cométabolisme due à la présence d'extrait de sol 10% dans les systèmes biphasiques. Trois différents systèmes biphasiques ont été constitués. Un des systèmes n'a pas reçu d'extrait de sol 10%, un témoin positif contenait de l'extrait de sol 10% et un témoin abiotique a été conçu par l'ajout d'azote de sodium. La figure 4.16 présente les cinétiques de dégradation des HAP présents dans ces systèmes biphasiques où seule la souche S9 a été ajoutée comme inoculum. Après 29 jours, la souche S9 a dégradé 34% du PYR et 100% du CHY dans la culture contenant de l'extrait de sol 10%. La culture ne contenant pas d'extrait de sol 10% a aussi présenté une certaine dégradation du PYR (19%) et du CHY (54%) en 29 jours. La souche S9 a donc démontré une capacité à dégrader le PYR et le CHY en l'absence d'extrait de sol 10%. Par contre, aucune des cultures n'a montré la dégradation du BAP.



◆ 11souches ■ 11 sauf S9_A ▲ S9 □ Témoin abiotique ◇ 11 sauf S9_B

Figure 4.14. Cinétique de dégradation du PYR (A) et du CHY (B) dans les différents systèmes biphasiques. Cette expérience a consisté à vérifier la capacité de dégradation d'un consortium reconstitué fait de 11 souches, comparé à un consortium contenant toutes les souches excepté la souche S9 et une culture contenant seulement la souche S9. Les concentrations initiales des HAP ont été de 80.5 mg/L de PYR, 51 mg/L de CHY et 93 mg/L de BAP. Cette expérience a été effectuée en duplicata.

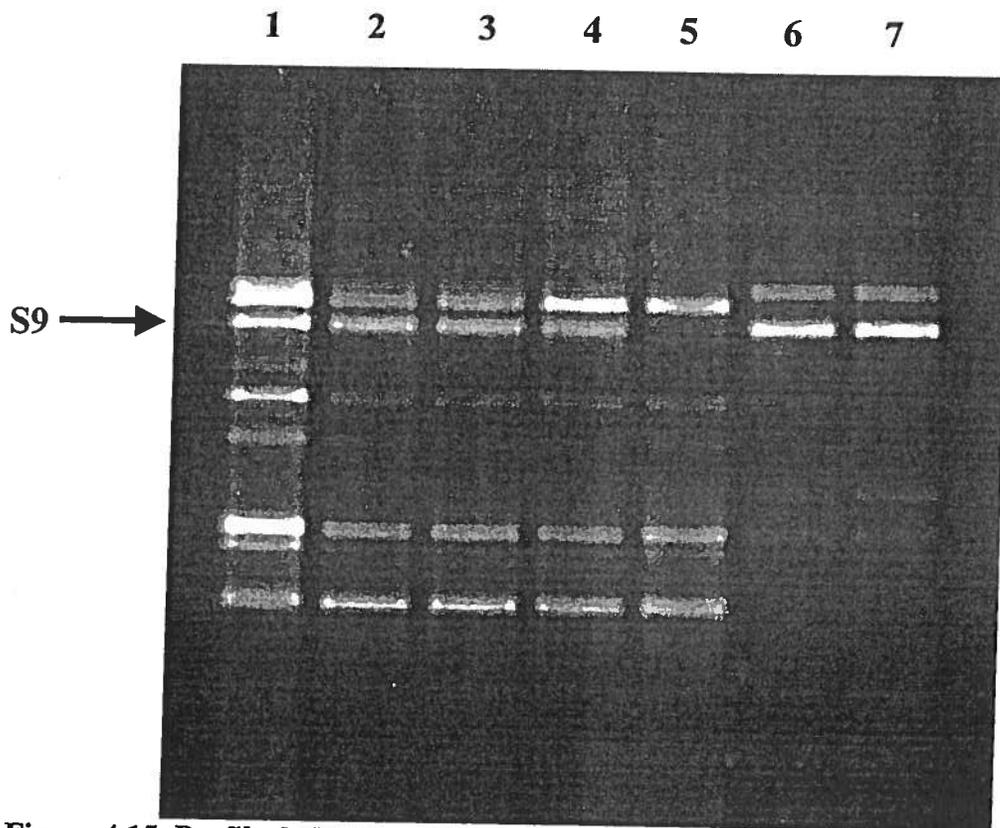


Figure 4.15. Profils de la diversité bactérienne retrouvée dans les différents systèmes biphasiques après 27 jours d'incubation. L'ADN total a été extrait des différents échantillons prélevés et les gènes 16S ribosomaux ont été amplifiés par PCR avant d'être séparés par DGGE (gel d'acrylamide 8% avec un gradient dénaturant allant de 30% à 70%) et révélés par coloration au bromure d'éthidium. **Colonne 1** : ADN des 11 souches isolées sur géloses ; **colonnes 2 et 3** : ADN provenant des fioles A et B, respectivement, inoculées avec les 11 souches au départ ; **colonnes 4 et 5** : ADN provenant des fioles A et B, respectivement, inoculées au départ avec toutes les souches sauf la souche S9 ; **colonnes 6 et 7** : ADN provenant des fioles A et B, respectivement, inoculées seulement avec la souche S9.

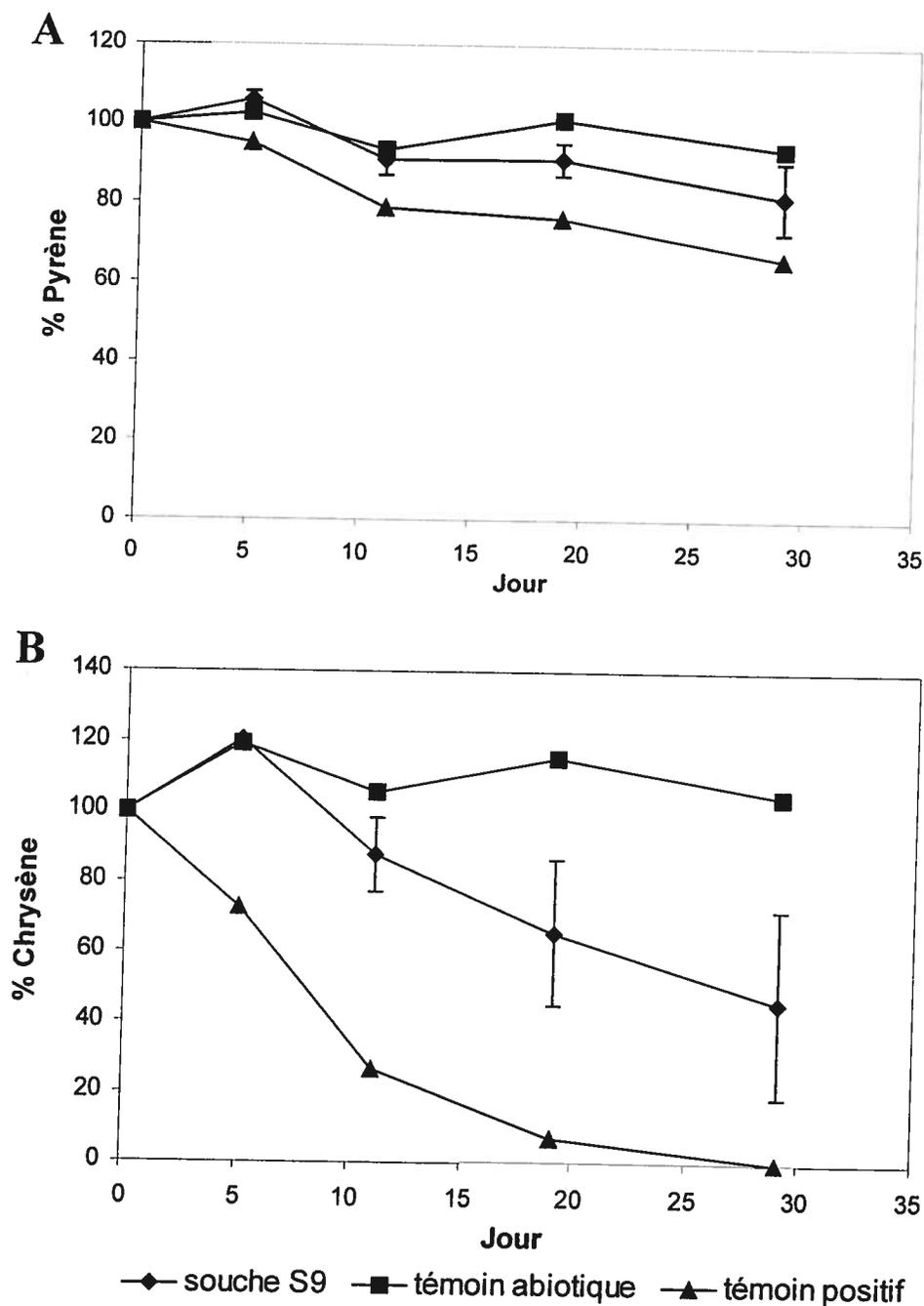


Figure 4.16. Cinétique de dégradation du PYR (A) et du CHY (B) dans les différents systèmes biphasiques pour vérifier la présence de cométabolisme. Un des systèmes ne contenait que les HAP comme source de carbone, tandis que le témoin positif était additionné d'extrait de sol 10%. Le témoin abiotique contenait de l'azoture de sodium tuant les microorganismes. Dans ces systèmes biphasiques, les quantités initiales de HAP ont été de 80 mg/L de PYR, 38 mg/L de CHY et 85 mg/L de BAP. La culture contenant la souche S9 a été faite en duplicata tandis que les témoins ont été faits en un seul exemplaire.

5. DISCUSSION

5.1 Étude de la dégradation des HAP dans les systèmes biphasiques

Les cinétiques de dégradation obtenues par rapport à la dégradation des HAP dans les systèmes biphasiques ont confirmé que le consortium étudié était capable de dégrader des HAP HPM. En effet, le consortium a dégradé 109 mg/L de PYR en 7 jours et 32 mg/L de CHY en 28 jours. La dégradation du CHY s'est ensuite pratiquement arrêtée jusqu'au jour 49. Pour ce qui est du BAP, aucune dégradation n'a été observée en 49 jours.

Les taux de dégradation obtenus étaient de l'ordre de $2.83 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le PYR (soit 1.09 mg de PYR dans un volume total de 0.055 L) et de $0.31 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le CHY (soit 0.303 mg de CHY dans un volume total de 0.055L, pour les 18 premiers jours). Ces résultats peuvent être comparés à ceux obtenus par deux autres études sur ce même consortium et en système biphasique. En effet, Marcoux (1998) a obtenu un taux de dégradation du PYR de $4.44 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ et de $0.63 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le CHY. Marcoux a utilisé pour cette expérience un volume total de 0.06 L dans des fioles de 250 mL. Quant à Gauthier (2001), des taux de dégradation de $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le PYR et de $0.71 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le CHY ont été obtenus. Gauthier est parvenue à ces résultats dans un volume total de 0.1 L dans des flasques de 1 L. Les résultats supérieurs que Gauthier (2001) a obtenus peuvent être expliqués par le fait que les expériences dans cette étude-ci et dans celle de Marcoux ont eu lieu dans des flasques de 250 mL contrairement à Gauthier qui a utilisé des flasques de 1000 mL. En effet, Marcoux (1998) a déjà noté que la cinétique de biodégradation des HAP HPM était plus rapide dans les flasques de 500 mL comparé à ceux de 250 mL. L'aire de l'interface entre les deux phases liquides étant plus grande dans les flasques de 500 mL, cela aurait favorisé la diffusion des HAP HPM vers la phase aqueuse et donc leur biodégradation (Marcoux, 1998). Villemur *et al.* (2000) ont même obtenu des taux de dégradation importants de $19 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le PYR et de $3.5 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ pour le CHY dans un volume total de 0.8 L dans des flasques de 2 L. Une autre raison qui a pu faire diminuer la cinétique de dégradation obtenue dans cette expérience est le fait que l'inoculum utilisé provenait du deuxième repiquage du consortium. Le

consortium a été auparavant congelé à -80°C depuis plusieurs mois et n'a subi que deux repiquages suite à sa décongélation avant de servir d'inoculum à cette expérience.

Pour ce qui est de la dégradation du CHY, l'arrêt de dégradation observé aux environs du vingtième jour peut être due à une accumulation de produits intermédiaires de la dégradation qui ont pu être toxiques pour les microorganismes présents. Un engorgement des voies de dégradation des HAP peut aussi être responsable. Ceci pourrait aussi expliquer pourquoi aucune dégradation du BAP n'a été observée. De plus, l'absence de dégradation du BAP a pu être due aux repiquages qui ont eu lieu auparavant et à la congélation du consortium pour plusieurs mois, ce qui aurait causé la perte de microorganismes dégradant le BAP.

Les profils de diversité bactérienne obtenus par PCR-DGGE ont montré la présence d'une vingtaine de bandes différentes sur le gel, ce qui correspond à une vingtaine d'espèces bactériennes (Fig. 4.2). Ces profils nous ont permis de constater que le consortium comportait un nombre assez important d'espèces. De plus, ces bactéries sont restées présentes dans les systèmes biphasiques tout au long de l'expérience puisque les échantillons pris aux jours 3, 8, 17 et 31 ont démontré une diversité très semblable. Les profils de diversité observés dans les échantillons pris dans la phase aqueuse et à l'interface étaient aussi très semblables, ce qui montre que les bactéries présentes étaient aussi adaptées à prendre les HAP à l'interface que dissous dans la phase aqueuse. Une autre possibilité est que la technique utilisée pour séparer la biomasse de l'interface de la phase aqueuse n'était pas adéquate. Il est possible de remarquer que trois bandes, identifiées par des flèches sur la figure 4.2, tendaient à disparaître complètement aux jours 17 et 31. Ces bandes pourraient correspondre à des espèces bactériennes plus spécifiques à la dégradation du PYR et du CHY qui était terminée ou pratiquement terminée à ce temps. D'autres études ont déjà rapporté des communautés comportant une importante diversité bactérienne dégradant des HAP. Vinas *et al.* (2005a) ont entre autres obtenu des profils DGGE de 19 à 24 bandes différentes dans des échantillons de deux sols distincts où se faisait la biodégradation des HAP. Vinas *et al.* (2005b) ont aussi étudié la diversité d'un consortium microbien obtenu par enrichissement en milieu liquide, utilisant

un mélange de HAP comme seule source de carbone. Ils ont alors pu identifier 19 microorganismes dont 6 suite au séquençage de l'ADN des bandes excisées sur DGGE. De plus, Kanaly *et al.* (2000) ont analysé un consortium microbien qui minéralise le BAP. Ce consortium a généré un profil DGGE de 12 bandes.

Une autre expérience a été réalisée dans cette étude afin de vérifier si le fait de maintenir le consortium bactérien en présence d'un seul HAP provoquerait des changements dans les profils de diversité bactérienne. La cinétique de dégradation du PYR (Fig. 4.3) a augmenté au cours des 3 repiquages, passant d'un taux de dégradation de $4.87 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ (1.34 mg dans un volume total de 0.055 L) dans la culture de départ à un taux de $8.12 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ dans la culture 4x (3^e repiquage). Cette augmentation du taux de dégradation peut montrer que les repiquages ont permis de favoriser les espèces bactériennes spécialisées dans la dégradation du PYR. La figure 4.4 présente les profils de diversité obtenus par PCR-DGGE sur les différents échantillons concernant la dégradation du PYR. Ces profils n'ont pas montré de changements importants au cours des repiquages. Par contre, nous avons remarqué que les bactéries ont colonisé l'interface et le cerne de façon beaucoup plus importante dans la culture 4x. Les bactéries présentes à l'interface et au cerne pourraient donc expliquer la dégradation plus efficace observée. Marcoux (1998) avait d'ailleurs noté que les microorganismes isolés de l'interface avaient dégradé plus rapidement les HAP HPM étudiés que les bactéries présentes dans la phase aqueuse. Pour ce qui est de la dégradation du CHY, le taux de dégradation est demeuré assez stable tout au long des repiquages (Fig. 4.5). Si nous tenions compte de la diminution du pourcentage de HAP observé dans le témoin abiotique, nous obtiendrions un taux de dégradation du CHY dans la fiole 1x de $0.77 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ (1.46 mg dans un volume total de 0.1 L). Les pertes remarquées dans le témoin abiotique peuvent être dues à des pertes abiotiques, mais dans ce cas-ci, elles ont pu être dues au fait qu'il y avait une concentration très élevée de CHY dans l'huile de départ de la fiole 1x et du contrôle abiotique. Gauthier (2001) a déterminé que la solubilité du CHY (faisant partie d'un mélange de quatre HAP) dans l'huile de silicone se situait aux environs de 73 mg/L . Il se peut donc qu'une certaine portion du CHY présent dans l'huile, utilisée seulement dans les cultures 1X et le témoin abiotique, ait formé des cristaux ce qui a mené à la baisse de

CHY dissout dans l'huile de silicone. Pour ce qui est de la cinétique de dégradation du CHY notée dans la fiole 4x, elle était de $0.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ J}^{-1}$ (0.7 mg dans un volume total de 0.1 L). La figure 4.6 nous présente les profils de diversité des différents échantillons pris des fioles 1X, 2X et 4X. Nous avons observé encore une fois que la biomasse présente au niveau de l'interface et du cerne est de plus en plus importante au fil des repiquages. La biomasse présente dans la phase aqueuse était aussi beaucoup plus importante après 7 jours dans la culture 4X que dans la culture 1X. Nous avons remarqué aussi que dans la culture 4X, la population bactérienne de la phase aqueuse et de l'interface était sensiblement la même tandis que le profil de la diversité du cerne est très différent. Il est donc possible de penser que certaines espèces bactériennes auraient été avantagées à former un biofilm sur les parois du système biphasique. Pour confirmer les résultats de ces expériences concernant la dégradation d'un HAP seul dans le système biphasique, il serait important de refaire ces expériences en triplicata, puisque cela n'a pas été effectué.

Dans cette étude, aucune expérience n'a été effectuée pour confirmer que la dégradation des HAP HPM par le consortium se faisait par minéralisation c'est-à-dire qu'ils étaient transformés en CO_2 et H_2O . Par contre, les travaux de Marcoux (1998) ainsi que Villemur *et al.* (2000) qui ont étudié le même consortium en système biphasique ont démontré par des essais de minéralisation que ce consortium minéralisait le PHE, le PYR et le CHY. Des expériences de minéralisation n'ont toutefois pas été effectuées sur le BAP.

5.2 Caractérisation du consortium bactérien

L'identification des bactéries constituant le consortium a permis d'avoir une meilleure idée de la diversité présente. Pour une étude approfondie de la diversité microbienne, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire est importante puisqu'il est souvent considéré que près de 99% des microorganismes dans l'environnement ne peuvent être isolés et cultivés en laboratoire (Amann *et al.*, 1995; Torsvik *et al.*, 1990).

Pour caractériser le consortium, une génothèque d'ADNr 16S a donc été créée, en plus d'utiliser la technique de culture et d'isolement sur gélose.

La génothèque a permis d'identifier 21 groupes de clones différents tandis que 11 souches ont été isolées sur gélose. D'ailleurs 3 des 11 souches ont été affiliées à des genres bactériens qui ont aussi été retrouvés dans la génothèque soit *Achromobacter*, *Sinorhizobium* et *Bosea*. Trois groupes de clones dans la génothèque ont pu être identifiés jusqu'à l'espèce grâce à leur haut pourcentage d'homologie avec des microorganismes connus soit *Rhodanobacter lindaniclasticus* (IAFIL35), *Pigmentiphaga kullae* (IAFIL23) et *Sinorhizobium adhaerens* (IAFIL47, IAFIL54). Parmi les 11 souches, 3 ont pu aussi être affiliées jusqu'à l'espèce soit *Nocardioides simplex* (souche S2), *Achromobacter denitrificans* (S7) et *Shinella zoogloeoides* (S8). En général, les pourcentages d'homologie de la plupart des clones ou des souches ont été assez élevés (plus de 95%) pour permettre une affiliation jusqu'au niveau du genre bactérien.

Les résultats obtenus par la caractérisation du consortium indiquent que les bactéries présentes sont principalement affiliées aux alphaprotéobactéries et aux betaprotéobactéries. En effet, les alphaprotéobactéries regroupent plus de 42% des clones de la génothèque et 5 des 11 souches caractérisées. Pour ce qui est des betaprotéobactéries, plus de 41% des clones de la génothèque y sont affiliés en plus de la souche S7. Au niveau de la diversité, les alphaprotéobactéries sont plus représentées avec 10 groupes de clones différents tandis que les betaprotéobactéries en compte 6 différents. Il n'est pas très surprenant d'obtenir des microorganismes appartenant aux alpha- et aux betaprotéobactéries dans le consortium. En effet, des bactéries appartenant à ces classes bactériennes sont très souvent retrouvées dans les sols (Janssen, 2006). De plus, plusieurs des genres bactériens présentés dans les tableaux 4.1 et 4.2 ont déjà été répertoriés dans la littérature comme ayant démontré une capacité à dégrader les HAP (Cerniglia, 1992; Juhasz et Naidu, 2000).

Les trois groupes de clones les plus importants dans la génothèque sont affiliés à *Pigmentiphaga kullae* (IAFIL23), *Achromobacter denitrificans* (IAFIL7, IAFIL85), deux

betaprotéobactéries, et à *Sinorhizobium adhaerens* (IAFIL47, IAFIL54), une alphaprotéobactérie. *Pigmentiphaga kullae* est une bactérie appartenant à la famille des *Alcaligenaceae* qui a été isolée du sol et qui est capable de dégrader des colorants azoïques dont le 1-(4'-carboxyphénylazo)-4-naphtol (Blümel *et al.*, 2001). Une autre souche, *P. kullae* NDS-2 a montré la capacité à utiliser le 2,6-naphtalènedisulfonate comme seule source de carbone (Uchihashi *et al.*, 2003). *Achromobacter denitrificans* (anciennement *Alcaligenes denitrificans*) fait partie des genres bactériens qui sont souvent retrouvés lors d'études sur la biodégradation des HAP ou de composés aromatiques (Andreoni *et al.*, 2004; Vinas *et al.*, 2005a et 2005b ; Medina-Moreno *et al.*, 2005 ; Daane *et al.*, 2001). De plus, Weissenfels *et al.* (1990; 1991) a aussi isolé du sol une souche de *Alcaligenes denitrificans* capable de dégrader le FLA et de cométaboliser le PYR et le BAA. Pour ce qui est de la souche *Sinorhizobium adhaerens*, un peu moins d'étude relate la capacité des bactéries appartenant au genre *Sinorhizobium* à dégrader les HAP. Keum et ses collaborateurs (2006) ont isolé, d'un site contaminé par les HAP, la souche *Sinorhizobium* sp. C4 qui peut utiliser le PHE comme seule source de carbone. Bodour et ses collaborateurs (2003) avaient aussi retrouvé le genre *Sinorhizobium* dans la communauté bactérienne qu'ils étudiaient et qui dégradait le PHE.

Plusieurs autres bactéries caractérisées dans le consortium sont reliées à des microorganismes dégradant les HAP. Certaines de ces bactéries font d'ailleurs partie de la famille des *Sphingomonadaceae* tels *Sphingobium yanoikuyae* (IAFIL46 et IAFIL83), *Sphingomonas* sp. (IAFIL81) et *Novosphingobium pentaromativorans* (souche S9). Des études portant sur la souche *S. yanoikuyae* B1 ont permis de constater que cette souche peut utiliser entre autres le biphényle, le NAP, le PHE et l'ANT comme seules sources de carbone et peut cométaboliser le BAP et le BAA (Gibson, 1999; Zylstra et Kim, 1997; Kim et Zylstra, 1999). Une souche mutante de *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (B8/36) a aussi montré qu'elle pouvait hydroxyler le CHY pour générer du chrysène *cis*-3,4-dihydrodiol (Boyd *et al.*, 1997). La souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 a aussi beaucoup été étudiée pour la dégradation des HAP. *S. paucimobilis* EPA505 peut minéraliser le FLA et cométaboliser plusieurs HAP HPM tels le PYR, le CHY, le BAP et le BAA (Ye *et al.*, 1996). Cette souche a aussi démontré la capacité à dégrader les HAP

présents dans un système biphasique. En fait, Vandermeer et Daugulis (2006) ont étudié entre autres la dégradation de certains HAP effectuée par un consortium constitué de deux souches soit *Sphingomonas aromaticivorans* B0695 et *S. paucimobilis* EPA505 présentes dans un système biphasique. Après 4 jours d'incubation, ce consortium avait dégradé tout le NAP, PHE et FLA présent, 84% du PYR et 34% du BAP présent dans le système biphasique contenant de l'huile de silicone comme phase hydrophobe. La dégradation du CHY par ce même mélange bactérien avait aussi été étudiée par Daugulis et McCracken (2003). Ce consortium a démontré en plus la capacité à dégrader le CHY dans un système biphasique contenant du dodecane. Une autre bactérie, *Sphingomonas sp.* CHY-1 a aussi montré sa capacité à dégrader le CHY, en plus de pouvoir croître en présence de NAP, de PHE et d'ANT (Willison, 2004). Le genre bactérien *Novosphingobium sp.*, auquel s'apparente la souche S9, est aussi lié à la dégradation des HAP. En effet, *N. pentaromativorans* peut dégrader le FLU, le PHE, le FLA, l'ANT, le PYR, le BAA, le CHY, le benzo[b]fluoranthène et le BAP (Sohn *et al.*, 2004). *N. taihuense* peut assimiler plusieurs composés aromatiques dont le phénol, le nitrobenzène et le PHE, mais pas l'ANT et le PYR (Liu *et al.*, 2005). La famille des *Sphingomonadaceae* est donc très impliquée dans la dégradation des HAP et que des microorganismes appartenant à cette famille sont en effet très souvent rencontrés dans les études de dégradation de composés aromatiques. La figure 4.9 montre d'ailleurs une classification phylogénétique des alphaprotéobactéries, dont font partie les *Sphingomonadaceae*, et qui permet de déterminer une meilleure affiliation de certains clones et souches présents dans le consortium. Par exemple, le clone IAFIL65 est affilié au genre *Afipia sp.* qui est un des genres bactériens retrouvés par Bodour *et al.* (2003) dans la communauté bactérienne dégradant le PHE qu'ils étudiaient. Selon la littérature, certains genres bactériens retrouvés dans la génothèque tels que *Caulobacter* (IAFIL56, IAFIL91), *Devosia* (IAFIL59), *Shinella* (souche S8) et *Mesorhizobium* (souche S10) n'ont pas été associés à la dégradation des HAP jusqu'ici.

D'autres alphaprotéobactéries présentes dans le consortium sont affiliées aux genres *Paracoccus* (IAFIL32) et *Bosea* (IAFIL13 ; souche S12). Dans la littérature, quelques études ont démontré la capacité de certaines souches de *Paracoccus sp.* à

dégrader les HAP. Guo et ses collaborateurs (2005) ont isolé d'un sol contaminé une souche affiliée à *Paracoccus versutus* qui pouvait utiliser le PHE, le FLA et le PYR comme seules sources de carbone. Une autre étude a permis d'isoler d'un sol contaminé aux HAP la souche *Paracoccus* sp. OPHE-1 qui peut entre autres utiliser l'ANT, le PHE, le FLU, le FLA, le CHY et le PYR comme seules sources de carbone (Zhang *et al.*, 2004). Quant au genre *Bosea*, les séquences d'ADNr 16S du clone IAFIL13 et de la souche S12 sont homologues à 98% à *Bosea thiooxidans* JS11 (DQ104985) isolée d'un sol contaminé aux HAP.

Plusieurs de nos clones sont affiliés à la famille des betaprotéobactéries. Les clones IAFIL26 et IAFIL84, affiliés à *Janthinobacterium* sp., sont homologues respectivement à 98% et 99% avec la souche *Janthinobacterium* sp. IC161 dégradant le carbazole, un composé hétérocyclique aromatique (Inoue *et al.*, 2005). Ces clones sont aussi homologues à 98% avec la souche *Oxalobacter* sp. Es2-1, une bactérie du sol dégradant le PHE (Vacca *et al.*, 2005) et à 97% avec une betaprotéobactérie isolée d'une communauté microbienne dégradant le PHE (Bodour *et al.*, 2003). Pour ce qui est du clone IAFIL50 affilié au genre *Herbaspirillum*, ce genre bactérien ne semble pas associé à la dégradation des HAP. Par contre, dans la littérature, des bactéries du genre *Herbaspirillum* ont été retrouvées comme membre d'un biofilm dégradant les biphényles polychlorés (Macedo *et al.*, 2005), en plus d'une souche dégradant le 2,3,4,6-tétrachlorophénol (Mannisto *et al.*, 2001), et de *H. chlorophenicum*, une souche dégradant le 4-chlorophénol (Im *et al.*, 2004).

Le seul représentant des gammaprotéobactéries dans la génothèque est *Rhodanobacter lindaniclasticus* (IAFIL35 et IAFIL11). Ce groupe de clones réunit plus de 7% des clones de la génothèque. *R. lindaniclasticus* a été caractérisée pour sa capacité à dégrader le lindane, un composé aliphatique hautement chloré (Nalin *et al.*, 1999). D'ailleurs, ce clone est à 98% homologue avec les souches *R. lindaniclasticus* czh-131 (DQ370020), caractérisée lors d'une étude sur des bactéries dégradant les HAP, et *Rhodanobacter* sp. BPC1, membre d'un consortium dégradant le BAP (Kanaly *et al.*, 2002).

Dans le consortium, la classe des *Actinobacteria* est aussi représentée par le clone IAFIL8 (*Leifsonia* sp.) et les souches S2 (*Nocardioides simplex*), S3 (*Micrococcus* sp.) et S5 (*Microbacterium* sp.). Le clone IAFIL8 est homologue à 98% avec une souche bactérienne utilisant le NAP (AF531474) tandis que la souche S2 est à 98% homologue à *Nocardioides* sp. A-3, une souche dégradant le dibenzofurane (Kubota *et al.*, 2005). Concernant le genre *Micrococcus*, une souche de *Micrococcus luteus* a par ailleurs montré la capacité à croître en présence de NAP ou de PHE comme seules sources de carbone (Toledo *et al.*, 2006). Pour ce qui est de la souche S5, affiliée à 98% à *Microbacterium esteraromaticum*, elle a déjà été isolée lors de la caractérisation initiale de ce même consortium par Gauthier et ses collaborateurs (2003), et a montré la capacité à dégrader le PHE, le PYR et le CHY. En 2004, Zhang et ses collaborateurs ont aussi identifié et caractérisé une bactérie du genre *Microbacterium*, soit la souche *Microbacterium* sp. Sphe1 dégradant le PHE.

Une autre souche identifiée dans le consortium est affiliée au genre *Bacillus* (souche S6). La souche *Bacillus pumilus* B44 fait aussi partie des souches caractérisées par Gauthier dans ce même consortium (Gauthier *et al.*, 2003), et avait alors démontré sa capacité à dégrader le PHE, le PYR et le CHY. Des bactéries appartenant au genre *Bacillus* et dégradant des HAP, soit le NAP et le PHE, ont déjà été caractérisées dans certaines études (Widada *et al.*, 2002 ; Aitken *et al.*, 1998).

La grande majorité des bandes du profil PCR-DGGE du consortium bactérien ont pu être affiliées à un clone en particulier (Fig. 4.8). Sur ce profil de migration, deux bandes, A et B, ont été affiliées à l'embranchement des Bacteroidetes, ou groupe CFB, suite à l'excision de ces bandes sur le gel et au séquençage de l'ADN. Dans la génothèque et les 11 souches caractérisées, d'autres bactéries ont aussi été affiliées à cet embranchement soit le clone IAFIL77 (*Niabilella* sp.), le clone IAFIL79 (*Sphingobacterium* sp.) et la souche S4 (*Chryseobacterium* sp.). Des bactéries appartenant au groupe Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides ont déjà été trouvées dans

certain consortium dégradant les hydrocarbures (Vinas *et al.*, 2005a et 2005b; Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995; Brakstad et Bonaunet, 2006; Widada *et al.*, 2002).

5.3 Caractérisation des souches isolées sur gélose

Des tests de vaporisation de différents HAP sur géloses ont été effectués dans le but de caractériser davantage les 11 souches isolées. La formation d'une zone claire (halo de dégradation) ou l'apparition d'un pigment sont des signes du potentiel de dégradation des HAP par ces souches. D'après le tableau 4.3, nous avons remarqué que peu de souches ont montré le potentiel à dégrader les HAP sur gélose. Les souches S2, S3, S4 et S5 (affiliées respectivement aux genres *Nocardioides*, *Micrococcus*, *Chryseobacterium* et *Microbacterium*) ont présenté un halo de dégradation suite à la vaporisation de NAP. La souche S9 a donné les résultats les plus intéressants. Cette souche, affiliée à *Novosphingobium sp.*, a montré le potentiel à dégrader sur gélose le NAP, le PHE et le PYR. Parmi les 11 souches, la souche S9 a été la seule à avoir démontré le potentiel à dégrader le PYR, un HAP HPM. La dégradation du PYR par la souche S9 a mené à la formation d'un pigment diffus de couleur jaune-brun. L'apparition de ces pigments est souvent associés à l'accumulation d'intermédiaires de la dégradation du HAP (Dagher *et al.*, 1997). Le fait que très peu de souches aient montré un potentiel à dégrader les HAP vaporisés sur gélose peut laisser croire que ces bactéries, isolées du consortium, ne participent pas directement à la dégradation des HAP HPM. Ces souches ne pourraient en effet que profiter des produits de dégradation des HAP dans le système ou même utiliseraient la matière organique retrouvée dans l'extrait de sol pour croître.

Des résultats négatifs pour le test de l'indole ont été observés pour les 11 souches testées. Ce test, utilisé surtout pour détecter la présence de dioxygénase telle la NAP dioxygénase, est basé sur le fait que l'indole peut se lier au centre catalytique de certaines enzymes de type dioxygénase pour être transformé en indigo. Certaines des souches testées peuvent quand même posséder des enzymes de type dioxygénase, mais le test de l'indole n'a pas permis de les détecter ou ces enzymes ne peuvent peut-être pas accueillir

l'indole dans leur site actif. Plusieurs auteurs ont déjà isolé des bactéries aptes à dégrader les HAP, mais répondant négativement au test de l'indole (Dagher *et al.*, 1997; Gauthier *et al.*, 2003; Ahn *et al.*, 1999).

5.4 Effet de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM et la diversité du consortium

Pour cette expérience, un des buts a été de déterminer si l'ajout de NAP ou de PHE pouvait avoir un effet sur la cinétique de dégradation des HAP HPM par le consortium. Concernant la biodégradation du PYR dans les systèmes biphasiques, l'ajout de PHE a ralenti la dégradation du PYR tandis que l'ajout de NAP n'a eu aucun effet si nous comparons au système biphasique n'ayant pas reçu de HAP FPM. Gauthier (2001), qui a étudié ce même consortium, avait aussi remarqué une diminution de la dégradation du PYR en présence de PHE. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette diminution de la dégradation. L'une des raisons les plus probables est reliée à la dégradation préférentielle, par les microorganismes, des sources de carbone les plus facilement dégradables. C'est-à-dire que les microorganismes préfèrent dégrader le PHE en premier, avant de dégrader le PYR qui est plus complexe (Providenti *et al.*, 1993). Bouchez *et al.* (1995) ont noté aussi que le phénomène d'inhibition était plus souvent observé lorsque le HAP ajouté est plus soluble que le HAP déjà présent. De plus, il se peut que ces HAP soient dégradés par une même voie métabolique et qu'il y ait compétition pour le site actif de l'enzyme, principalement pour l'oxygénase initiale. Il se peut aussi qu'une accumulation de métabolites toxiques cause le ralentissement de la dégradation du PYR en présence de PHE (Bouchez *et al.*, 1995).

Pour ce qui est de la dégradation du CHY, le NAP a eu un effet positif tandis que le PHE n'a eu aucun effet. La dégradation du BAP a quant à elle été stimulée suite à l'ajout tant du NAP que du PHE. D'ailleurs, il est intéressant de remarquer que dans toutes les expériences effectuées, c'est uniquement dans le cas d'ajout de NAP ou de PHE qu'une dégradation importante de BAP a été observée. Plusieurs auteurs ont déjà rapporté

l'effet stimulateur de l'ajout de HAP FPM sur la dégradation de HAP HPM (Marcoux, 1998; Gauthier, 2001; Juhasz *et al.*, 1996, 1997; Chen *et al.*, 1999; Aitken *et al.*, 1998). Cet effet stimulateur serait lié à une augmentation de l'activité métabolique dû à la présence de HAP plus facilement dégradables, soit les HAP FPM (Juhasz et Naidu, 2000). Des réactions de dégradation par cométabolisme peuvent aussi avoir lieu lors de l'ajout de NAP et de PHE ce qui amène un effet synergique augmentant ainsi la cinétique de dégradation d'autres HAP présents (Johnsen *et al.*, 2005). Une autre réaction qui peut s'être produite lors de l'ajout de NAP et de PHE est la sélection d'une certaine population bactérienne mieux adaptée à métaboliser rapidement les HAP présents (Bauer et Capone, 1988). Nous avons remarqué que l'ajout de NAP et de PHE a conduit à une baisse de la diversité du consortium en général et à l'importance accrue de certaines bandes (Fig. 4.13). En effet, la diversité retrouvée dans la culture n'ayant reçu aucun HAP FPM est demeurée sensiblement la même après 34 jours dans la phase aqueuse. L'ajout de PHE et de NAP a mené, dans les deux cas, à l'apparition d'une bande très intense dans tous les puits, et ce dès le jour 13. Les échantillons provenant des cernes des cultures avec PHE ont montré des profils contenant plutôt 3 bandes importantes. Pour ce qui est des cultures ayant reçu du NAP, les échantillons des cernes ont montré deux bandes. L'identification bactérienne liée aux trois bandes les plus importantes sur les profils DGGE a permis de déterminer leur affiliation aux Bacteroidetes, au genre *Sphingobium* sp. et à *Achromobacter denitrificans*. Les bactéries associées à ces bandes ont donc eu plus de facilité à dégrader les HAP et ont pu ainsi coloniser les cernes des cultures et être bien présentes aussi dans la phase aqueuse. Ces trois bandes ont été d'ailleurs affiliées à des genres bactériens qui sont souvent retrouvés dans la littérature comme pouvant dégrader une grande variété de HAP tel que discuté à la section 5.2.

5.5 Détection de gènes de dégradation de produits aromatiques

Plusieurs gènes sont impliqués dans la dégradation des produits aromatiques. Les gènes codant pour des enzymes de type dioxygénase sont très étudiés puisque ce sont souvent des enzymes clés dans ces voies de dégradation. D'ailleurs, ces gènes de

dégradation servent souvent de cibles pour détecter la présence de bactéries impliquées dans la biodégradation des HAP. Les gènes les plus souvent étudiés sont impliqués dans la dégradation du NAP et du PHE; peu d'études concernent les gènes de dégradation des HAP HPM. Le but de notre expérience a été donc, à partir d'amorces plus ou moins dégénérées, de détecter des gènes pouvant être impliqués dans la dégradation des HAP HPM étudiés.

Chez les 11 souches isolées du consortium, très peu de gènes de dégradation ont été détectés. En fait, parmi toutes les souches, seule la souche S9 (affiliée à *Novosphingobium* sp.) a montré un résultat positif et ce pour la présence des gènes *xyIE* et *bphC* (sphingo). Cette même souche a aussi donné des résultats intéressants lors des tests de vaporisation de HAP sur gélose, démontrant alors son potentiel à dégrader le NAP, le PHE et le PYR sur gélose. Les pourcentages d'homologie en acides nucléiques sont assez élevés soit 86% pour le gène *xyIE* et 85% pour le gène *bphC*, mais assez différents pour laisser supposer de nouvelles propriétés associées à ces dioxygénases. D'autres souches possédant les gènes *bphC* et *xyIE* ont déjà été rapportées dans la littérature. Par exemple, la souche *Sphingomonas yanoikuyae* B1 possède ces deux gènes et est capable d'utiliser le toluène, le *m*-xylène, le *p*-xylène, le biphenyle, le NAP, le PHE et l'ANT comme seules sources de carbone et d'énergie. Les gènes *xyIE* et *bphC* codent tous les deux pour des dioxygénase impliquées dans le clivage en position *meta*. Selon Kim et Zylstra (1995), le fait que ces deux gènes soient retrouvés chez la même souche suppose que les enzymes associées seraient donc impliquées à deux étapes distinctes dans la voie de dégradation de composés aromatiques comme le biphenyle. La voie de dégradation du biphenyle comprend en effet deux étapes où ce type d'enzyme est requis. BphC serait impliquée dans le clivage du cycle aromatique d'un composé polycyclique dihydroxylé comme le 1,2-dihydroxynaphtalène ou le 2,3-dihydroxybiphenyle tandis que la dioxygénase *xyIE* est reliée davantage au clivage du cycle aromatique d'un composé dihydroxylé tels le catéchol et le 3-méthylcatéchol (Zylstra et Kim, 1997; Kim et Zylstra, 1995). Les gènes *xyIE* et *bphC* ont aussi été détectés dans l'ADN total du consortium avec une homologie de 99% avec la séquence d'une catéchol 2,3-dioxygénase chez *Sphingomonas* sp. pour l'amplification du gène *xyIE* et 100% avec une enzyme de type extradiol dioxygénase

chez la souche *Sphingomonas* sp. CHY-1 pour le gène *bphC*. Les pourcentages d'homologie sont beaucoup plus élevés pour ces gènes retrouvés dans le consortium que ceux détectés chez la souche S9, ceci laisse donc supposer que les gènes détectés dans l'ADN du consortium proviendrait d'autres bactéries que la souche S9.

Il est assez surprenant que le gène *nahAc* (relié à la NAP dioxygénase) n'ait pas été détecté dans l'ADN total du consortium et qu'aucune des 11 souches ne possède ce gène puisque 5 de ces souches ont donné un résultat positif (la formation d'une zone claire de dégradation) lors du test de vaporisation des HAP pour le NAP. Ces souches utiliseraient donc une autre voie de dégradation pour le catabolisme du NAP que celle faisant appel aux gènes *nah*. Ces résultats viennent aussi appuyer le fait qu'aucune des souches n'a été positive lors du test de l'indole qui détecte habituellement la présence de la NAP dioxygénase. D'autres études (Goyal et Zylstra, 1996; Fredrickson *et al.*, 1991) ont aussi rapporté la présence de microorganismes dégradant le NAP et le PHE, mais qui ne possédaient pas les gènes classiques *nah* selon leurs expériences d'hybridation.

De plus, il est possible de constater dans le tableau 4.4 que la souche *Mycobacterium gilvum* B1, isolée antérieurement du consortium lors de l'étude effectuée par Gauthier (2001), possède le gène *nidA*. Chez plusieurs mycobactéries dégradant les HAP, un système enzymatique comprenant une dioxygénase impliquée dans les étapes initiales de la dégradation des HAP a en effet été trouvé (Brezna *et al.*, 2003). Une des enzymes impliquées est la dioxygénase comportant une petite sous-unité β , *nidB*, et une grande sous-unité (α), *nidA*. Les souches possédant les gènes *nidA* et *nidB* ont particulièrement été retrouvées impliquées dans la dégradation du PYR et du PHE (Dean-Ross et Cerniglia, 1996; Kim *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2001; Stingley *et al.*, 2004). La séquence du gène *nidA* détecté chez la souche *M. gilvum* B1 a eu une homologie de 99% avec une séquence codant pour la protéine *nidA* chez *Mycobacterium flavescens*. Le gène *nidA* a aussi été amplifié dans l'ADN total du consortium bactérien étudié. Le séquençage de ce produit de PCR a donné une homologie de 97% avec un gène codant pour *nidA* chez *M. gilvum* BB1. *M. flavescens* et *M. gilvum* BB1 sont en effet deux des espèces chez lesquelles les gènes *nidAB* ont été retrouvés (Brezna *et al.*, 2003). Il est intéressant

d'avoir pu détecter le gène *nidA* dans le consortium bactérien étudié. La souche *M. gilvum* B1, qui avait déjà été isolée du consortium par Gauthier (2001) n'a pas été identifiée ni dans la génothèque d'ADNr 16S, ni dans les différentes souches isolées sur gélose dans cette étude. Cette détection d'un gène *nidA* présent dans l'ADN total du consortium laisse donc supposer soit que la souche *M. gilvum* B1 était encore présente dans le consortium ou du moins qu'une souche de *Mycobacterium* fait partie du consortium bactérien.

Par contre, concernant les gènes *phnAc*, *bphC* (*Pseudomonas*) et *todC*, nous ne pouvons pas conclure à l'absence de ces gènes chez les souches puisque aucun contrôle positif n'a été utilisé avec les gènes. Seul un contrôle positif ciblant l'ADNr 16S a été utilisé lors des amplifications par PCR. Les conditions idéales pour toutes les amorces ciblant ces gènes n'étaient donc peut-être pas réunies pour obtenir une détection de ces gènes.

5.6 Étude de la capacité de dégradation des souches caractérisées

Une des expériences effectuées a servi à évaluer la capacité de dégradation d'un « nouveau » consortium constitué des 11 souches caractérisées à la section 4.3.3. Comme la souche S9 (*Novosphingobium* sp.) semblait importante pour la dégradation des HAP, vu la présence de gènes de dégradation et des résultats au test de vaporisation, son rôle dans la capacité de dégradation du consortium reconstitué a été évalué. Dans les cultures contenant seulement la souche S9 et celles contenant les 11 souches, tout le CHY présent a été dégradé dans les systèmes biphasiques et une bonne partie du PYR aussi soit 31% de PYR pour la souche S9 seule et 42% de PYR pour la fiole avec 11 souches. Une première observation intéressante qu'on remarque à partir de ces résultats est l'ordre de dégradation des HAP. Habituellement, l'ordre de dégradation des HAP suit le degré de solubilité allant du plus soluble au moins soluble, donc les HAP ayant un poids moléculaire plus faible sont dégradés plus rapidement (Cerniglia, 1992). C'est d'ailleurs

ce qui avait été observé à la section 4.1, soit que le PYR est souvent dégradé avant le CHY. Avec le consortium reconstitué et principalement la souche S9, le CHY a été ici dégradé en premier et le PYR suit par la suite. On peut donc penser que la souche S9 a une certaine facilité, ou préférence, à dégrader le CHY comparé au PYR; ses gènes de dégradation sont peut-être plus spécifiques pour le CHY. De plus, nous avons observé que le taux de dégradation du PYR est plus important d'environ 10% dans les cultures contenant les 11 souches comparé à ceux obtenus dans les cultures contenant seulement la souche S9. Ceci peut s'expliquer par le fait que les autres espèces présentes ont pu aider à la dégradation des HAP présents, dégrader les HAP par cométabolisme ou même empêcher l'accumulation d'intermédiaires de la dégradation qui, lorsqu'ils s'accumulent, pourraient devenir toxiques pour les bactéries présentes et ralentir le taux de dégradation. Ce phénomène avait d'ailleurs été rapporté par Kazunga et Aitken (2000).

Les cultures en duplicata contenant toutes les souches sauf S9, ont montré des divergences après 12 jours. En effet, après une période de latence dans les 12 premiers jours, une dégradation du CHY et du PYR a été observée dans la culture A (11 sauf S9_A) et ce jusqu'à la fin de l'expérience, tandis que la culture B s'est comportée exactement comme le témoin abiotique ne démontrant aucune dégradation ni pour le PYR ou le CHY. Les profils obtenus par PCR-DGGE ont permis d'observer la diversité présente dans les différents systèmes biphasiques après 27 jours d'incubation. On remarque tout de suite que les profils des cultures duplicata ayant été inoculées avec toutes les souches sauf S9 sont différents (Fig. 4.15, colonnes 4 et 5). Une bande, reliée à souche S9, est en effet présente dans le profil de la culture «11 sauf S9_A». Pourtant, la souche S9 n'a pas été inoculée dans cette culture au début de l'expérience. Ce profil différent, nous indique alors que la souche S9 serait responsable de la dégradation des HAP observée dans cette culture. La culture « 11 sauf S9_A » a donc probablement été contaminée durant cette expérience aux environs du 12^e jour. Ceci nous a malgré tout permis de confirmer le rôle important joué par la souche S9 dans le consortium reconstitué.

Une dernière expérience a permis de déterminer que la dégradation des HAP HPM effectuée par la souche S9 n'était pas une réaction de cométabolisme due à la présence d'extrait de sol. L'extrait de sol 10% ajouté aux différents systèmes biphasiques contient une charge organique importante (DCO : 1012 mg/L) qui constitue une source de carbone considérable dans les systèmes. Une telle charge organique peut être observée par exemple dans les eaux d'égout non traitées (DCO : 250-1000 mg/L) (Tarchitzky *et al.*, 2006). Le système biphasique inoculé avec la souche S9 et ne contenant pas d'extrait de sol a présenté une dégradation de 54% de CHY et 18% de PYR en 29 jours. Un témoin positif, additionné d'extrait de sol, a montré une dégradation complète du CHY et de 34% de PYR en 29 jours. Nous avons pu constater que l'ajout d'extrait de sol favorise une meilleure cinétique de dégradation par l'apport de différents nutriments. Par contre, nous avons pu vérifier que la souche S9 pouvait bel et bien transformer des HAP HPM en molécules plus simples ou même possiblement les utiliser comme seule source de carbone.

6. CONCLUSION

La biodégradation des HAP HPM est souvent plus complexe vu leur nature physico-chimique. En effet, ces composés sont très peu solubles dans l'eau et tendent à s'adsorber à la matière organique ce qui les rend peu disponibles aux bactéries qui peuvent les dégrader. Les systèmes biphasiques représentent une méthode intéressante pour remédier à ce problème. Ces systèmes permettent en fait aux HAP HPM d'être dissous dans une phase liquide hydrophobe et de pouvoir par la suite diffuser vers la phase aqueuse. Le consortium bactérien étudié dans ce travail a été enrichi pour dégrader les HAP HPM dans un système biphasique.

Afin d'acquérir de meilleures connaissances sur la composition et les caractéristiques de ce consortium bactérien et sur la dégradation des HAP HPM, différentes expériences ont été réalisées. Une des expériences a permis de constater que la diversité du consortium, pendant la dégradation du PYR et du CHY, est demeurée pratiquement identique durant les 31 jours d'incubation et ce tant dans la phase aqueuse qu'à l'interface. De plus, une autre étude consistant à maintenir le consortium en présence d'un seul HAP pendant plusieurs repiquages a permis de remarquer, dans le cas du PYR, une augmentation de la cinétique de dégradation. Les profils de diversité ont aussi montré qu'au fil des repiquages, la biomasse était plus importante principalement au niveau du cerne et de l'interface ce qui aurait augmenté l'efficacité de dégradation des HAP.

Par la suite, les travaux de caractérisation du consortium ont permis d'identifier plusieurs espèces composant ce mélange bactérien. La génothèque d'ADNr 16S a permis d'identifier 21 groupes de clones différents tandis que 11 souches ont été isolées sur gélose. Les résultats obtenus indiquent que les bactéries présentes sont principalement affiliées aux alphaprotéobactéries et aux betaprotéobactéries. Les trois groupes de clones les plus importants dans la génothèque sont affiliés à *Pigmentiphaga kullae*, *Achromobacter denitrificans* et à *Sinorhizobium adhaerens*. Les autres clones ou souches sont affiliés aux classes des gammaprotéobactéries, des actinobactéries, des bacilli et au groupe CFB. D'ailleurs, plusieurs des bactéries identifiées dans ce consortium sont affiliées à des genres bactériens qui ont déjà été reliés à la dégradation d'hydrocarbures.

Le rôle que chacune de ces espèces joue dans la dégradation des HAP HPM étudiés reste cependant plutôt indéterminé. Il serait intéressant de tenter d'isoler certaines bactéries du consortium sur des géloses constituées seulement de milieu de sels minéraux et d'un HAP HPM étudié. La méthode SIP (*stable isotope probing*) (Radajweski *et al.*, 2000) pourrait aussi être envisagée dans le but de déterminer, à l'aide du source de carbone telle le pyrène-¹³C, quelles bactéries seraient impliquées dans la dégradation de cet HAP en particulier.

Un autre objectif était de déterminer l'effet de l'ajout de NAP ou de PHE, tous deux des HAP FPM, sur la dégradation de HAP HPM et sur la diversité du consortium dans les systèmes biphasiques. L'ajout de NAP n'a eu aucun effet sur la dégradation du PYR, mais a augmenté la dégradation du CHY et du BAP. L'ajout de PHE a ralenti la dégradation du PYR, n'a eu aucun effet sur le CHY et a augmenté la dégradation du BAP. L'augmentation de la cinétique de dégradation suite à l'ajout de ces HAP plus facilement biodégradables pourrait être attribuée à une augmentation de l'activité métabolique, à des réactions de cométabolisme ou à une sélection d'une certaine population bactérienne mieux adaptée à métaboliser les HAP présents. D'ailleurs les profils obtenus par PCR-DGGE lors de cette expérience montrent en effet que trois espèces semblent avoir été particulièrement avantagées par l'ajout de NAP et de PHE comparé à la diversité retrouvée dans la culture normale. Ces trois bandes sur le profil DGGE ont pu être affiliées à des espèces appartenant aux genres *Sphingobium* sp., *Achromobacter* sp. et à l'embranchement des Bacteroidetes.

L'étude a aussi portée sur la détection de certains gènes de dégradation de composés aromatiques. Trois types de gènes ont été détectés dans le consortium bactérien soit les gènes *xyIE* (*Sphingomonas*), *bphC* (*Sphingomonas*) et *nidA*. Parmi les 11 souches étudiées, c'est seulement chez la souche S9 (affiliée à *Novosphingobium* sp.) que les gènes *xyIE* et *bphC* ont été détectés. *XylE* code pour une catéchol 2,3-dioxygénase, *bphC* code pour une 2,3-dihydroxybiphényle 1,2-dioxygénase et *nidA* pour un type de dioxygénase retrouvée chez les mycobactéries. On peut donc penser que ces gènes sont impliqués dans la dégradation des HAP HPM étudiés. Pour obtenir plus d'information sur

les gènes de dégradation des HAP, il serait bien de trouver des contrôles positifs pour les gènes *phnAc*, *bphC* (*Pseudomonas*) et *todC* et refaire les expériences dans le but de pouvoir déterminer leur présence dans le consortium. Des amorces dégénérées concernant d'autres gènes de dégradation observés dans la littérature pourraient aussi être conçues. De plus, il serait intéressant de suivre le niveau d'expression de ces gènes par transcription inverse (RT-PCR) durant la dégradation de différents HAP, mais aussi en présence d'inducteurs.

Un dernier objectif consistait à étudier la capacité de dégradation des 11 souches isolées sur gélose. Les expériences ont démontré que le nouveau mélange bactérien constitué des 11 souches était en mesure de dégrader le PYR et CHY dans un système biphasique. Toutefois, les recherches ont montré que parmi ce nouveau mélange bactérien, la souche S9 était la souche principalement responsable de la dégradation du PYR et du CHY. De plus, la souche S9 dégrade plus efficacement le CHY que le PYR. D'autres expériences ont d'ailleurs établi que la dégradation des HAP effectuée par la souche S9 n'était pas une réaction de cométabolisme, mais que cette souche pouvait bel et bien transformer les HAP en molécules plus simples et possiblement les utiliser comme source de carbone et d'énergie. Pour continuer cette étude, il serait intéressant d'ajouter des essais de minéralisation des HAP et aussi des expériences concernant l'identification d'intermédiaires de la dégradation des HAP étudiés.

Dans l'ensemble, cette étude a permis d'obtenir beaucoup d'information sur la diversité bactérienne présente au niveau du consortium étudié. L'utilisation d'un système biphasique et d'un consortium enrichi pour dégrader les HAP HPM peut se présenter comme une méthode de traitement biologique prometteuse. Les systèmes biphasiques représentent de plus un outil de recherche très intéressant lorsqu'on désire étudier la dégradation de composés plutôt hydrophobes.

RÉFÉRENCES

- Ahn, Y., J. Sanseverino et G. S. Sayler (1999). "Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils." Biodegradation **10**(2): 149-157.
- Aitken, M. D., W. T. Stringfellow, R. D. Nagel, C. Kazunga et S. H. Chen (1998). "Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons." Can J Microbiol **44**(8): 743-752.
- Amann, R. I., W. Ludwig et K. H. Schleifer (1995). "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation." Microbiol Rev **59**(1): 143-169.
- Ambrosoli, R., L. Petruzzelli, J. Luis Minati et F. Ajmone Marsan (2005). "Anaerobic PAH degradation in soil by a mixed bacterial consortium under denitrifying conditions." Chemosphere **60**(9): 1231-1236.
- Amir, S., M. Hafidi, G. Merlina, H. Hamdi et J. C. Revel (2005). "Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons during composting of lagooning sewage sludge." Chemosphere **58**(4): 449-458.
- Andreoni, V., L. Cavalca, M. A. Rao, G. Nocerino, S. Bernasconi, E. Dell'Amico, M. Colombo et L. Gianfreda (2004). "Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils." Chemosphere **57**(5): 401-412.
- Ascon-Cabrera, M. et J. M. Lebeault (1995a). "Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system." J Ferment Bioeng **80**: 270-275.
- Ascon-Cabrera, M. et J. M. Lebeault (1995b). "Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms." Appl Microbiol Biotechnol **43**: 1136-1141.
- Ashelford, K. E., N. A. Chuzhanova, J. C. Fry, A. J. Jones et A. J. Weightman (2005). "At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies." Appl Environ Microbiol **71**(12): 7724-7736.
- Baird, W. M., L. A. Hooven et B. Mahadevan (2005). "Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action." Environ Mol Mutagen **45**(2-3): 106-114.

- Bastiaens, L., D. Springael, P. Wattiau, H. Harms, R. deWachter, H. Verachtert et L. Diels (2000). "Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers." Appl Environ Microbiol **66**(5): 1834-1843.
- Bauer, J. E. et D. G. Capone (1988). "Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries." Appl Environ Microbiol **54**(7): 1649-1655.
- Blumel, S., B. Mark, H. J. Busse, P. Kampfer et A. Stolz (2001). "*Pigmentiphaga kullae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Alcaligenaceae with the ability to decolorize azo dyes aerobically." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 5): 1867-1871.
- Bodour, A. A., J. M. Wang, M. L. Brusseau et R. M. Maier (2003). "Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system." Environ Microbiol **5**(10): 888-895.
- Boonchan, S., M. L. Britz et G. A. Stanley (2000). "Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures." Appl Environ Microbiol **66**(3): 1007-1019.
- Bouchez, M., D. Blanchet, V. Bardin, F. Haeseler et J. P. Vandecasteele (1999). "Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures." Biodegradation **10**(6): 429-435.
- Bouchez, M., D. Blanchet et J. P. Vandecasteele (1995). "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism." Appl Microbiol Biotechnol **43**(1): 156-164.
- Boyd, D. R., N. D. Sharma, R. Agarwal, S. M. Resnick, M. J. Schocken, D. T. Gibson, J. M. Sayer, H. Yagi et D. M. Jerina (1997). "Bacterial dioxygenase-catalysed dihydroxylation and chemical resolution routes to enantiopure *cis*-dihydrodiols of chrysene." J Chem Soc Perkin Trans 1: 1715-1723.
- Boyd, D. R., N. D. Sharma, F. Hempenstall, M. A. Kennedy, J. F. Malone, C. C. R. Allen, S. M. Resnick et D. T. Gibson (1999). "*bis-cis*-Dihydrodiols: a new class of metabolites from biphenyl dioxygenase-catalyzed sequential asymmetric *cis*-dihydroxylation of polycyclic arenes and heteroarenes." J Org Chem **64**: 4005-4011.
- Brakstad, O. G. et K. Bonaunet (2006). "Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 degrees C) and bacterial communities associated with degradation." Biodegradation **17**(1): 71-82.

- Brezna, B., A. A. Khan et C. E. Cerniglia (2003). "Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp." FEMS Microbiol Lett **223**(2): 177-183.
- Cerniglia, C. E. (1992). "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons." Biodegradation **3**: 351-368.
- Chang, W., Y. Um, B. Hoffman et T. R. Pulliam Holoman (2005). "Molecular characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading methanogenic communities." Biotechnol Prog **21**(3): 682-688.
- Chang, W., Y. Um et T. R. Holoman (2006). "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation Coupled to Methanogenesis." Biotechnol Lett **28**(6): 425-430.
- Chaudhry, G. Rasul (Éd.) (1994). "Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals." Portland, OR: Dioscorides Press, 515p.
- Chen, S.-H. et M. D. Aitken (1999). "Salicylate Stimulates the Degradation of High-Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15." Environ Sci Technol **33**: 435-439.
- Coates, J. D., R. T. Anderson et D. R. Lovley (1996). "Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons under Sulfate-Reducing Conditions." Appl Environ Microbiol **62**(3): 1099-1101.
- Collins, L. D. et A. J. Daugulis (1997). "Characterization and optimization of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol." Appl Microbiol Biotechnol **48**(1): 18-22.
- Collins, L. D. et A. J. Daugulis (1999). "Simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application." Biotechnol Prog **15**(1): 74-80.
- Daane, L. L., I. Harjono, G. J. Zylstra et M. M. Haggblom (2001). "Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2683-2691.
- Dagher, F., E. Deziel, P. Lirette, G. Paquette, J. G. Bisailon et R. Villemur (1997). "Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils." Can J Microbiol **43**(4): 368-377.
- Daly, K., A. C. Dixon, R. P. Swannell, J. E. Lepo et I. M. Head (1997). "Diversity among aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and their meta-cleavage genes." J Appl Microbiol **83**(4): 421-429.

- Daugulis, A. J. (1997). "Partitioning bioreactors." Curr Opin Biotechnol 8(2): 169-174.
- Daugulis, A. J. (2001). "Two-phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics." Trends Biotechnol 19(11): 457-462.
- Daugulis, A. J. et C. M. McCracken (2003). "Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp." Biotechnol Lett 25(17): 1441-1444.
- Davies, J. I. et W. C. Evans (1964). "Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism." Biochem J 91(2): 251-261.
- Dean-Ross, D. et C. E. Cerniglia (1996). "Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*." Appl Microbiol Biotechnol 46(3): 307-312.
- Déziel, E., Y. Comeau et R. Villemur (1999). "Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds." Biodegradation 10(3): 219-33.
- Dunn, N. W. et I. C. Gunsalus (1973). "Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*." J Bacteriol 114(3): 974-979.
- Edwards, U., T. Rogall, H. Blocker, M. Emde et E. C. Bottger (1989). "Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA." Nucleic Acids Res 17(19): 7843-7853.
- Efroymsen, R. A. et M. Alexander (1995). "Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in non-aqueous-phase liquids." Environ Sci Technol 29: 515-521.
- El Aalam, S., A. Pauss et J. M. Lebeault (1993). "High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic/water continuous reactor." Appl Microbiol Biotechnol 39: 696-699.
- Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett and D. T. Gibson (1983). "Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo." Science 222(4620): 167-169.
- Fredrickson, J. K., F. J. Brockman, D. J. Workman, S. W. Li et T. O. Stevens (1991). "Isolation and Characterization of a Subsurface Bacterium Capable of Growth on Toluene, Naphthalene, and Other Aromatic Compounds." Appl Environ Microbiol 57(3): 796-803.

- Gardin, H., J. M. Lebeault et A. Pauss (1999). "Biodegradation of xylene and butyl acetate using an aqueous-silicon oil two-phase system." Biodegradation **10**(3): 193-200.
- Gauthier, E. (2001). "Biodégradation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques de haut poids moléculaire par un consortium microbien dans des cultures biphasiques" Mémoire de maîtrise. INRS-Institut Armand-Frappier, Laval. 135p.
- Gauthier, E., E. Déziel, R. Villemur, P. Juteau, F. Lépine et R. Beaudet (2003). "Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system." J Appl Microbiol **94**(2): 301-311.
- Gibson, D. T. (1999). "*Beijerinckia* sp. strain B1: a strain by any other name." J Ind Microbiol Biotechnol **23**(4-5): 284-293.
- Goldman, R., L. Enewold, E. Pellizzari, J. B. Beach, E. D. Bowman, S. S. Krishnan et P. G. Shields (2001). "Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue." Cancer Res **61**(17): 6367-6371.
- Goyal, A. K. et G. J. Zylstra (1996). "Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39." Appl Environ Microbiol **62**(1): 230-236.
- Goyal, A. K. et G. J. Zylstra (1997). "Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*." J Ind Microbiol Biotechnol **19**(5-6): 401-407.
- Grimm, A. C. et C. S. Harwood (1999). "NahY, a catabolic plasmid-encoded receptor required for chemotaxis of *Pseudomonas putida* to the aromatic hydrocarbon naphthalene." J Bacteriol **181**(10): 3310-3316.
- Grosser, R. J., D. Warshawsky et J. R. Vestal (1991). "Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils." Appl Environ Microbiol **57**(12): 3462-3469.
- Guieysse, B., M. D. Cirne et B. Mattiasson (2001). "Microbial degradation of phenanthrene and pyrene in a two-liquid phase-partitioning bioreactor." Appl Microbiol Biotechnol **56**(5-6): 796-802.
- Guieysse, B. et G. Viklund (2005). "Sequential UV-biological degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in two-phases partitioning bioreactors." Chemosphere **59**(3): 369-376.
- Guieysse, B., G. Viklund, A. C. Toes et B. Mattiasson (2004). "Combined UV-biological degradation of PAHs." Chemosphere **55**(11): 1493-1499.

- Guo, C. L., H. W. Zhou, Y. S. Wong et N. F. Tam (2005). "Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential." Mar Pollut Bull **51**(8-12): 1054-1061.
- Habe, H. et T. Omori (2003). "Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria." Biosci Biotechnol Biochem **67**(2): 225-243.
- Hall, K., C. D. Miller, D. L. Sorensen, A. J. Anderson et R. C. Sims (2005). "Development of a catabolically significant genetic probe for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading mycobacteria in soil." Biodegradation **16**(5): 475-484.
- Harayama, S. (1997). "Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design." Curr Opin Biotechnol **8**(3): 268-273.
- Heitkamp, M. A. et C. E. Cerniglia (1988). "Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field." Appl Environ Microbiol **54**(6): 1612-1614.
- Heitkamp, M. A. et C. E. Cerniglia (1989). "Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem." Appl Environ Microbiol **55**(8): 1968-1973.
- Huber, T., G. Faulkner et P. Hugenholtz (2004). "Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments." Bioinformatics **20**(14): 2317-2319.
- Hugenholtz, P., B. M. Goebel et N. R. Pace (1998). "Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity." J Bacteriol **180**(18): 4765-4774.
- Im, W. T., H. S. Bae, A. Yokota et S. T. Lee (2004). "*Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 3): 851-855.
- Inoue, K., H. Habe, H. Yamane, T. Omori et H. Nojiri (2005). "Diversity of carbazole-degrading bacteria having the car gene cluster: isolation of a novel gram-positive carbazole-degrading bacterium." FEMS Microbiol Lett **245**(1): 145-153.
- Integrated Risk Information System (IRIS), U.S. Environmental Protection Agency, <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>
- Janssen, P. H. (2006). "Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes." Appl Environ Microbiol **72**(3): 1719-1728.

- Jimenez, I. Y. et R. Bartha (1996). "Solvent-Augmented Mineralization of Pyrene by a *Mycobacterium* sp." Appl Environ Microbiol **62**(7): 2311-2316.
- Johnsen, A. R. et U. Karlson (2004). "Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons." Appl Microbiol Biotechnol **63**(4): 452-459.
- Johnsen, A. R., L. Y. Wick et H. Harms (2005). "Principles of microbial PAH-degradation in soil." Environ Pollut **133**(1): 71-84.
- Juhasz, A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley (1996). "Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*." Biotechnol Lett **18**: 577-582.
- Juhasz, A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley (1997). "Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and dibenz[*a,h*]anthracene by *Burkholderia cepacia*." J Appl Microbiol **83**: 189-198.
- Juhasz, A. L. et R. Naidu (2000). "Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene." Int Biodeterior Biodegradation **45**: 57-88.
- Kanaly, R. A., R. Bartha, K. Watanabe et S. Harayama (2000). "Rapid mineralization of benzo[*a*]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel." Appl Environ Microbiol **66**(10): 4205-4211.
- Kanaly, R. A. et S. Harayama (2000). "Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria." J Bacteriol **182**(8): 2059-2067.
- Kanaly, R. A., S. Harayama et K. Watanabe (2002). "*Rhodanobacter* sp. strain BPC1 in a benzo[*a*]pyrene-mineralizing bacterial consortium." Appl Environ Microbiol **68**(12): 5826-5833.
- Kanaly, R. A. et H. G. Hur (2006). "Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH." Chemosphere **63**(2): 202-211.
- Kazunga, C. et M. D. Aitken (2000). "Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria." Appl Environ Microbiol **66**(5): 1917-1922.
- Keum, Y. S., J. S. Seo, Y. Hu et Q. X. Li (2006). "Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4." Appl Microbiol Biotechnol **71**(6): 935-941.

- Khan, A. A., R. F. Wang, W. W. Cao, D. R. Doerge, D. Wennerstrom et C. E. Cerniglia (2001). "Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1." Appl Environ Microbiol **67**(8): 3577-3585.
- Khan, A. A., S. J. Kim, D. D. Paine et C. E. Cerniglia (2002). "Classification of a polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing bacterium, *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, as *Mycobacterium vanbaalenii* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 6): 1997-2002.
- Kim, E. et G. J. Zylstra (1995). "Molecular and biochemical characterization of two meta-cleavage dioxygenases involved in biphenyl and m-xylene degradation by *Beijerinckia* sp. strain B1." J Bacteriol **177**(11): 3095-3103.
- Kim, E. et G. J. Zylstra (1999). "Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Shingomonas yanoikuyae* B1." J Ind Microbiol Biotechnol **23**(4-5): 294-302.
- Kim, S. J., O. Kweon, J. P. Freeman, R. C. Jones, M. D. Adjei, J. W. Jhoo, R. D. Edmondson et C. E. Cerniglia (2006). "Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1." Appl Environ Microbiol **72**(2): 1045-1054.
- Kiyohara, H., K. Nagao et K. Yana (1982). "Rapid Screen for Bacteria Degrading Water-Insoluble, Solid Hydrocarbons on Agar Plates." Appl Environ Microbiol **43**(2): 454-457.
- Kubota, M., K. Kawahara, K. Sekiya, T. Uchida, Y. Hattori, H. Futamata et A. Hiraishi (2005). "*Nocardioides aromaticivorans* sp. nov., a dibenzofuran-degrading bacterium isolated from dioxin-polluted environments." Syst Appl Microbiol **28**(2): 165-174.
- La Rosa, G., E. De Carolis, M. Sali, M. Papacchini, C. Riccardi, A. Mansi, E. Paba, C. Alquati, G. Bestetti et M. Muscillo (2006). "Genetic diversity of bacterial strains isolated from soils, contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, by 16S rRNA gene sequencing and amplified fragment length polymorphism fingerprinting." Microbiol Res **161**(2): 150-157.
- Lei, A. P., Z. L. Hu, Y. S. Wong et N. F. Tam (2007). "Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species." Bioresour Technol **98**(2): 273-280.
- Liu, Z. P., B. J. Wang, Y. H. Liu et S. J. Liu (2005). "*Novosphingobium taihuense* sp. nov., a novel aromatic-compound-degrading bacterium isolated from Taihu Lake, China." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 3): 1229-1232.

- Loi canadienne sur la protection de l'environnement (LCPE), Environnement Canada, "Première liste de substances d'intérêt prioritaire: Hydrocarbures aromatiques polycycliques", http://www.ec.gc.ca/substances/ese/fre/pesip/lsip1_HAPs.cfm
- Luz, A. P., V. H. Pellizari, L. G. Whyte et C. W. Greer (2004). "A survey of indigenous microbial hydrocarbon degradation genes in soils from Antarctica and Brazil." Can J Microbiol **50**(5): 323-333.
- Macedo, A. J., U. Kuhlicke, T. R. Neu, K. N. Timmis et W. R. Abraham (2005). "Three stages of a biofilm community developing at the liquid-liquid interface between polychlorinated biphenyls and water." Appl Environ Microbiol **71**(11): 7301-7309.
- MacLeod, C. T. et A. J. Daugulis (2003). "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor in the presence of a bioavailable solvent." Appl Microbiol Biotechnol **62**(2-3): 291-296.
- Mahaffey, W. R., D. T. Gibson et C. E. Cerniglia (1988). "Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[*a*]anthracene." Appl Environ Microbiol **54**(10): 2415-2423.
- Mannisto, M. K., M. A. Tirola et J. A. Puhakka (2001). "Degradation of 2,3,4,6-tetrachlorophenol at low temperature and low dioxygen concentrations by phylogenetically different groundwater and bioreactor bacteria." Biodegradation **12**(5): 291-301.
- Marcoux, J. (1998). "Étude de la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques de haut poids moléculaire en système multiphasique". Mémoire de maîtrise, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval. 124p.
- Marcoux, J., E. Déziel, R. Villemur, F. Lépine, J. G. Bisailon et R. Beaudet (2000). "Optimization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons' degradation in a two-liquid-phase bioreactor." J Appl Microbiol **88**(4): 655-662.
- Marsh, T. L. (1999). "Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products." Curr Opin Microbiol **2**(3): 323-327.
- Mcnelly, D. L., J. R. Mihelcic et D. R. Lueking (1998). "Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions." Environ Sci Technol **32**: 2633-2639.
- Meckenstock, R. U., E. Annweiler, W. Michaelis, H. H. Richnow et B. Schink (2000). "Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture." Appl Environ Microbiol **66**(7): 2743-2747.

- Medina-Moreno, S. A., S. Huerta-Ochoa et M. Gutierrez-Rojas (2005). "Hydrocarbon biodegradation in oxygen-limited sequential batch reactors by consortium from weathered, oil-contaminated soil." Can J Microbiol **51**(3): 231-239.
- Meyer, S., R. Moser, A. Neef, U. Stahl and P. Kampfer (1999). "Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes." Microbiology **145** (Pt 7): 1731-1741.
- Morgan, P. et R. J. Watkinson (1989). "Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment." Crit Rev Biotechnol **8**(4): 305-333.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattmann et P. H. Pritchard (1990). "Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*." Appl Environ Microbiol **56**(4): 1079-1086.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman et P. H. Pritchard (1989). "Action of a Fluoranthene-Utilizing Bacterial Community on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Components of Creosote." Appl Environ Microbiol **55**(12): 3085-3090.
- Muyzer, G. (1999). "DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems." Curr Opin Microbiol **2**(3): 317-322.
- Muyzer, G., E. C. de Waal et A. G. Uitterlinden (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Appl Environ Microbiol **59**(3): 695-700.
- Nalin, R., P. Simonet, T. M. Vogel et P. Normand (1999). "*Rhodanobacter lindaniclasticus* gen. nov., sp. nov., a lindane-degrading bacterium." Int J Syst Bacteriol **49** Pt 1: 19-23.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) (1985). "Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984." Eur J Biochem **150**(1): 1-5.
- Providenti, M. A., H. Lee et J. T. Trevors (1993). "Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds." J Ind Microbiol **12**: 379-395.
- Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh et J. C. Murrell (2000). "Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology." Nature **403**(6770): 646-649.
- Rehmann, K., H. P. Noll, C. E. Steinberg et A. A. Kettrup (1998). "Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2." Chemosphere **36**(14): 2977-2992.

- Rockne, K. J., J. C. Chee-Sanford, R. A. Sanford, B. P. Hedlund, J. T. Staley et S. E. Strand (2000). "Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions." Appl Environ Microbiol **66**(4): 1595-1601.
- Saito, A., T. Iwabuchi et S. Harayama (1999). "Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides* sp. KP7." Chemosphere **38**(6): 1331-1337.
- Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue et D. Warshawsky (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**(1): 13-19.
- Singleton, D. R., S. N. Powell, R. Sangaiyah, A. Gold, L. M. Ball et M. D. Aitken (2005). "Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1202-1209.
- Sohn, J. H., K. K. Kwon, J. H. Kang, H. B. Jung et S. J. Kim (2004). "*Novosphingobium pentaromativorans* sp. nov., a high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from estuarine sediment." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 5): 1483-1487.
- Stingley, R. L., A. A. Khan et C. E. Cerniglia (2004). "Molecular characterization of a phenanthrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1." Biochem Biophys Res Commun **322**(1): 133-146.
- Sylvestre, M. (1980). "Isolation Method for Bacterial Isolates Capable of Growth on *p*-Chlorobiphenyl." Appl Environ Microbiol **39**(6): 1223-1224.
- Tarchitzky, J., O. Lerner, U. Shani, G. Arye, A. Lowengart-Aycicegi, A. Brener et Y. Chen (2006). "Water distribution pattern in treated wastewater irrigated soils: hydrophobicity effect" Eur J Soil Sci (sous presse).
- Toledo, F. L., C. Calvo, B. Rodelas et J. Gonzalez-Lopez (2006). "Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities." Syst Appl Microbiol **29**(3): 244-252.
- Torsvik, V., J. Goksoyr et F. L. Daae (1990). "High diversity in DNA of soil bacteria." Appl Environ Microbiol **56**(3): 782-787.
- Trzesicka-Mlynarz, D. et O. P. Ward (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**(6): 470-476.

- Tuomi, P. M., J. M. Salminen et K. S. Jorgensen (2004). "The abundance of *nahAc* genes correlates with the 14C-naphthalene mineralization potential in petroleum hydrocarbon-contaminated oxic soil layers." FEMS Microbiol Ecol **51**(1): 99-107.
- Uchihashi, K., T. Misawa, M. Takeo et S. Negoro (2003). "Mutational analysis of the metabolism of 2,6-naphthalenedisulfonate by *Pigmentiphaga* sp. NDS-2." J Biosci Bioeng **95**(5): 476-482.
- Vacca, D. J., W. F. Bleam et W. J. Hickey (2005). "Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene." Appl Environ Microbiol **71**(7): 3797-3805.
- Vandermeer, K. D. et A. J. Daugulis (2006). "Enhanced Degradation of a Mixture of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Defined Microbial Consortium in a Two-Phase Partitioning Bioreactor." Biodegradation (*sous presse*).
- Villemur, R., E. Déziel, A. Benachenhou, J. Marcoux, E. Gauthier, F. Lépine, R. Beudet et Y. Comeau (2000). "Two-liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil." Biotechnol Prog **16**(6): 966-972.
- Vinas, M., J. Sabate, M. J. Espuny et A. M. Solanas (2005a). "Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil." Appl Environ Microbiol **71**(11): 7008-7018.
- Vinas, M., J. Sabate, C. Guasp, J. Lalucat et A. M. Solanas (2005b). "Culture-dependent and -independent approaches establish the complexity of a PAH-degrading microbial consortium." Can J Microbiol **51**(11): 897-909.
- Walter, U., M. Beyer, J. Klein et H. J. Rehm (1991). "Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1." Appl Microbiol Biotechnol **34**: 671-676.
- Warshawsky, D., T. Cody, M. Radike, R. Reilman, B. Schumann, K. LaDow et J. Schneider (1995). "Biotransformation of benzo[*a*]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light." Chem Biol Interact **97**(2): 131-148.
- Watanabe, K. et P. W. Baker (2000). "Environmentally relevant microorganisms." J Biosci Bioeng **89**(1): 1-11.
- Watanabe, K. (2001). "Microorganisms relevant to bioremediation." Curr Opin Biotechnol **12**(3): 237-241.

- Weissenfels, W. D., M. Beyer et J. Klein (1990). "Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures." Appl Microbiol Biotechnol **32**(4): 479-484.
- Weissenfels, W. D., M. Beyer, J. Klein et H. J. Rehm (1991). "Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products." Appl Microbiol Biotechnol **34**: 528-535.
- Widada, J., H. Nojiri, K. Kasuga, T. Yoshida, H. Habe et T. Omori (2002). "Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites." Appl Microbiol Biotechnol **58**(2): 202-209.
- Willison, J. C. (2004). "Isolation and characterization of a novel sphingomonad capable of growth with chrysene as sole carbon and energy source." FEMS Microbiol Lett **241**(2): 143-150.
- Wilson, S. C. et K. C. Jones (1993). "Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review." Environ Pollut **81**(3): 229-249.
- Xue, W. et D. Warshawsky (2005). "Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review." Toxicol Appl Pharmacol **206**(1): 73-93.
- Ye, D., M. A. Siddiqi, A. E. Maccubbin, S. Kumas et H. C. Sikka (1996). "Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*." Environ Sci Technol **30**: 136-142.
- Yen, K. M. et I. C. Gunsalus (1985). "Regulation of naphthalene catabolic genes of plasmid NAH7." J Bacteriol **162**(3): 1008-1013.
- Yen, K. M. et C. M. Serdar (1988). "Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads." Crit Rev Microbiol **15**(3): 247-268.
- Yu, K. S., A. H. Wong, K. W. Yau, Y. S. Wong et N. F. Tam (2005a). "Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments." Mar Pollut Bull **51**(8-12): 1071-1077.
- Yu, S. H., L. Ke, Y. S. Wong et N. F. Tam (2005b). "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments." Environ Int **31**(2): 149-154.

- Zhang, H., A. Kallimanis, A. I. Koukkou et C. Drainas (2004). "Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils." Appl Microbiol Biotechnol **65**(1): 124-131.
- Zylstra, G. J. et E. Kim (1997). "Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1." J Ind Microbiol Biotechnol **19**: 408-414.