

Université du Québec  
INRS - Institut Armand-Frappier

**BIODÉGRADATION  
D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES  
DE HAUT POIDS MOLÉCULAIRE  
PAR UN CONSORTIUM MICROBIEN  
DANS DES CULTURES BIPHASIQUES**

Par  
Émilie Gauthier

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

François Lépine, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Maria Elektorowicz, Département de génie civil,  
Université Concordia

Directeur de recherche

Réjean Beaudet, INRS - Institut Armand-Frappier

## RÉSUMÉ

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants très hydrophobes, dont la faible biodisponibilité occasionne une persistance dans l'environnement. Cet effet est encore plus marqué pour les HAP de haut poids moléculaire (HPM). L'utilisation d'un bioréacteur de type biphasique, comportant une phase aqueuse et une phase hydrophobe, permet d'augmenter la biodisponibilité des HAP et d'atteindre des cinétiques de dégradation des HAP plus élevées. Les buts de ce projet étaient d'optimiser la dégradation de quatre HAP HPM (pyrène, chrysène, benzo[a]pyrène et pérylène) dans un système biphasique (utilisant l'huile de silicone) par un consortium microbien et d'en étudier certains membres. En fonction des conditions utilisées, des performances de dégradation jusqu'à 110 mg/L en deux jours pour le pyrène, 70 mg/L en 20 jours pour le chrysène, et 90 mg/L en 30 jours pour le benzo[a]pyrène ont été atteintes par le consortium. Généralement, le pérylène a été peu dégradé par le consortium dans les conditions utilisées. La proportion du système biphasique occupée par la phase hydrophobe (10, 30 ou 40%) a peu ou pas influencé les cinétiques de dégradation des quatre HAP. L'étude a révélé que la présence de HAP de faible poids moléculaire (FPM), soit le phénanthrène ou des vapeurs de naphthalène, pouvait stimuler, inhiber ou ne pas avoir d'effet sur la dégradation par le consortium, selon les HAP HPM étudiés. L'effet positif du phénanthrène sur la dégradation du benzo[a]pyrène a été relié à l'addition répétée de phénanthrène dans les cultures, suggérant des phénomènes de cométabolisme. Parmi les microorganismes composant le consortium, 22 types morphologiques différents dégradant des HAP ont été isolés, dont tous dégradent le phénanthrène, la majorité le pyrène et le chrysène, et une plus faible proportion, le benzo[a]pyrène. Aucun microorganisme dégradant le pérylène n'a pu être isolé. Les essais ont démontré que les cinétiques de dégradation des HAP variaient selon le milieu de croissance utilisé et les HAP présents. Le pyrène et le chrysène ont exercé un effet de stimulation de la dégradation du benzo[a]pyrène chez *Mycobacterium gilvum* (isolat B1) et chez un isolat relié au genre *Porphyrobacter* (isolat B51), respectivement. La séquence de dégradation des HAP était variable d'un isolat à l'autre. Deux isolats sur quatre ont pu croître sur milieu gélosé lorsque le naphthalène sous forme de vapeurs était l'unique source de carbone disponible. Aucun des isolats étudiés n'a pu transformer l'indole en indigo. Lors du test de vaporisation des HAP sur gélose, l'apparition d'un pigment brun non diffusible a parfois été visible dans les colonies, suggérant l'accumulation d'un intermédiaire de dégradation chez ces isolats. Tous les isolats ont démontré une localisation à l'interface de la phase hydrophobe des cultures biphasiques croissante au fil du temps, l'isolat B51 étant celui démontrant le plus de croissance à l'interface lorsque du

naphtalène ou du phénanthrène était présent. Les résultats obtenus montrent que le consortium microbien étudié renferme un grand nombre de microorganismes différents, possédant des capacités variées de dégradation des HAP et que des interactions parfois complexes, selon les HAP présents et les conditions de cultures, peuvent survenir. Des études subséquentes sur les interrelations survenant entre les microorganismes permettraient de comprendre davantage la dynamique des populations du consortium dans des cultures biphasiques.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Réjean Beaudet, pour son excellente supervision et pour la confiance qu'il m'a témoigné tout au long de ce projet. Il a su me prodiguer des conseils expérimentés et me consacrer toute l'aide et le temps requis pour la réalisation de mon projet.

Je remercie aussi chaleureusement Éric Déziel pour ses précieux conseils et sa grande disponibilité. Éric s'est montré très impliqué dans le projet et a su m'encourager et me motiver à me dépasser tout au long de ma maîtrise.

Je tiens à remercier le Dr Richard Villemur pour l'identification des quatre isolats, de même que Rita Alary, Louis Racine, Francine Turcotte-Rivard, Maude Saucier, Sylvain Milot, de même que les Dr Pierre Juteau et François Lépine, qui ont tous participé de près ou de loin à la réalisation de mon projet.

Je suis reconnaissante à Jean-François Dubé et à Monique Godin pour leur implication dans les aspects informatiques et la correction de la langue française de ce mémoire, de même que pour leur soutien constant au cours de mes études.

Finalement, je remercie la Fondation Armand-Frappier et les ministères de la Métropole et des Affaires Municipales pour leur financement au cours de mes études graduées.

## TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iv
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
<b>1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Revue de littérature</b> .....	<b>5</b>
2.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	6
2.1.1 Réglementation.....	6
2.1.2 Origine des HAP.....	6
2.1.3 Structure des HAP.....	7
2.1.4 Risques des HAP sur la santé.....	7
2.2 Biodégradabilité et traitement des HAP.....	8
2.2.1 Persistance des HAP dans l'environnement.....	8
2.2.2 Contamination par un mélange de HAP.....	9
2.2.3 Contamination par des produits dérivés des HAP.....	10
2.2.4 Traitements de dépollution.....	10
2.2.4.1 Traitements physico-chimiques et thermiques.....	10
2.2.4.2 Traitements biologiques.....	11
2.3 Microorganismes métabolisant les HAP.....	13
2.3.1 Adaptation des microorganismes à une contamination.....	13
2.3.2 Ubiquité des microorganismes dégradant les HAP.....	14
2.3.2.1 Bactéries.....	14
2.3.2.2 Champignons.....	15
2.3.3 Bactéries dégradant les HAP.....	16
2.3.3.1 Historique de la découverte de bactéries dégradant les HAP	16
HPM.....	18
2.3.4 Champignons et algues dégradant les HAP.....	18
2.3.5 Consortium microbien.....	19
2.3.6 Microorganismes anaérobies.....	20

2.4 Voies de dégradation des HAP et enzymes impliquées.....	21
2.4.1 Acquisition des HAP par les microorganismes.....	21
2.4.2 Voies bactériennes de dégradation des HAP.....	21
2.4.2.1 Voies de dégradation du NAP.....	22
2.4.2.2 Voies de dégradation des autres HAP.....	23
2.4.2.3 Voies de dégradation des bactéries anaérobies.....	26
2.4.2.4 NAP dioxygénase et autres oxygénases bactériennes.....	26
2.4.2.5 Inducteurs de dégradation des HAP.....	27
2.4.2.5.1 Salicylate.....	27
2.4.2.5.2 HAP.....	28
2.5 Dégradation des HAP par cométabolisme.....	29
2.5.1 Cométabolisme chez les bactéries.....	29
2.5.2 Cométabolisme chez les champignons et voies de dégradation des HAP.....	30
2.6 Système biphasique.....	31
2.6.1 Enrichissement de microorganismes.....	32
2.6.2 Taux de transfert de masse.....	32
2.6.3 Principe du système biphasique et acquisition des polluants par les microorganismes.....	33
2.6.4 Choix de la phase hydrophobe et de sa proportion.....	35
2.6.5 Agents tensioactifs.....	36
2.6.5.1 Effets positifs des surfactants synthétiques.....	36
2.6.5.2 Effets négatifs, mitigés ou absence d'effet des surfactants synthétiques.....	37
2.6.5.3 Production de biosurfactants et de bioémulsifiants.....	37
2.6.6 Hydrophobicité des microorganismes.....	39
2.7 Conclusion.....	40
<b>3 Matériel et Méthodes.....</b>	<b>41</b>
3.1 Produits chimiques et milieux de culture.....	42
3.1.1 HAP et solutions stock utilisés.....	42
3.1.2 Préparation des fioles expérimentales.....	42
3.1.3 Milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'étude de souches microbiennes provenant du consortium.....	43
3.2 Extraction des HAP de l'huile de silicone et dosage par HPLC.....	44
3.3 Enrichissement et conservation du consortium microbien.....	45
3.3.1 Méthode d'enrichissement.....	45

3.3.2	Méthode de conservation par congélation du consortium microbien et des souches isolées.....	45
3.4	Étude et optimisation de la phase hydrophobe du système biphasique.....	46
3.4.1	Solubilité des HAP dans l'huile de silicone.....	46
3.4.2	Effet du volume d'huile de silicone sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM.....	46
3.5	Effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM.....	46
3.5.1	Effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER.....	47
3.5.1.1	Mesure de l'adsorption du PER au sol.....	47
3.5.1.2	Comparaison des pertes abiotiques entre des témoins contenant du sol et de l'extrait de sol.....	47
3.5.2	Effet du NAP sur la dégradation du PER.....	48
3.5.3	Effet du NAP et du PHE sur la dégradation du PYR, du CHY et du BAP.....	48
3.6	Isolement et étude de microorganismes provenant du consortium microbien.....	48
3.6.1	Isolement de microorganismes.....	48
3.6.2	Caractérisation préliminaire des isolats.....	49
3.6.2.1	Test de vaporisation des géloses avec un film de HAP.....	49
3.6.2.2	Transformation de l'indole en indigo : détection de l'enzyme NAP dioxygénase.....	50
3.6.3	Caractérisation de dix types microbiens provenant du deuxième isolement.....	51
3.6.4	Étude et caractérisation approfondie de quatre isolats prometteurs.....	51
3.6.4.1	Autres caractéristiques de croissance.....	51
3.6.4.2	Mesure de la tension de surface.....	51
3.6.4.3	Étude de la localisation des isolats B1, B21, B44 et B51 dans le système biphasique.....	52
3.6.4.3.1	Dosage des protéines cellulaires.....	52
3.6.4.4	Effet du PYR et du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51.....	53
<b>4</b>	<b>Résultats</b> .....	54
4.1	Étude et optimisation de la phase hydrophobe.....	55
4.1.1	Solubilité des HAP dans l'huile de silicone.....	55
4.1.2	Effet du volume d'huile de silicone sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM.....	56

4.2 Effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM.....	58
4.2.1 Effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER.....	58
4.2.1.1 Comparaison des pertes abiotiques entre des témoins contenant du sol et de l'extrait de sol.....	60
4.2.2 Effet du NAP sur la dégradation du PER.....	62
4.2.3 Effet du NAP et du PHE sur la dégradation du PYR, du CHY et du BAP.....	64
4.3 Isolement et étude de microorganismes provenant du consortium microbien.....	66
4.3.1 Isolement de microorganismes et caractérisation préliminaire des isolats d'intérêt	66
4.3.2 Caractérisation de quatre isolats dégradant les HAP.....	70
4.3.3 Étude de la localisation des isolats B1, B21, B44 et B51 dans le système biphasique.....	74
4.3.4 Effet du PYR et du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51.....	82
<b>5 Discussion</b> .....	84
5.1 Étude et optimisation de la phase hydrophobe.....	85
5.1.1 Comparaison de la solubilité des HAP seuls et en mélange.....	85
5.1.2 Proportion d'huile de silicone.....	87
5.2 Effet des HAP sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM.....	87
5.2.1 Remplacement du sol par de l'extrait de sol.....	89
5.2.2 Effets de HAP FPM sur la dégradation de HAP HPM par le consortium.....	93
5.3 Modification de la flore microbienne du consortium dans le temps.....	94
5.4 Étude de microorganismes isolés du consortium.....	94
5.4.1 Leur isolement.....	96
5.4.2 Caractérisation des microorganismes.....	98
5.4.3 Transformation de l'indole en indigo et test de vaporisation des HAP.....	100
5.4.4 Caractérisation des isolats B1, B21, B44 et B51.....	102
5.4.5 Étude de la localisation des isolats B1, B21, B44 et B51 dans le système biphasique.....	106
<b>6 Conclusion</b> .....	111
<b>Annexes</b> .....	115
<b>Références</b> .....	115



**LISTE DES TABLEAUX****Résultats**

Tableau 1 : Solubilités dans l'huile de silicone des cinq HAP utilisés dans le cadre de cette étude, selon les mélanges dont ils font partie.....	55
Tableau 2 : Capacités de dégradation des isolats A1 à A12 envers le mélange de cinq HAP étudié .....	67
Tableau 3 : Caractérisation préliminaire de dix isolats différents.....	68
Tableau 4 : Description morphologique des colonies des dix isolats décrits au tableau 3.....	70
Tableau 5 : Caractérisation des isolats B1, B21, B44 et B51, en ce qui a trait à différentes propriétés de croissance et de dégradation des HAP.....	71

## LISTE DES FIGURES

### Revue bibliographique

Figure 1 : Voies de dégradation suggérées pour le métabolisme aérobie des HAP chez les eucaryotes et les procaryotes.....	25
Figure 2 : Schéma d'un réacteur de type biphasique et du mode d'acquisition du substrat par les microorganismes.....	34

### Résultats

Figure 3 : Effet de différentes proportions d'huile de silicone sur la dégradation d'un mélange d'HAP HPM par le consortium.....	57
Figure 4 : Effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER.....	59
Figure 5 : Comparaison des pertes abiotiques de HAP HPM entre des témoins contenant du sol ou de l'extrait de sol et comparaison avec la cinétique de dégradation de cultures inoculées.....	61
Figure 6 : Effet du NAP sur la dégradation du PER par le consortium.....	63
Figure 7 : Effet du NAP et du PHE sur la dégradation des HAP HPM PYR, CHY et BAP...	65
Figure 8 : Formation d'une zone claire dans un film de PYR autour d'une colonie de l'isolat B51 et production d'un pigment brun.....	69
Figure 9 : Cinétiques de dégradation des HAP par les isolats B1, B21, B44 et B51 dans un système biphasique.....	73
Figure 10 : Localisation de l'isolat B1 dans le système biphasique dans le temps.....	75
Figure 11 : Localisation de l'isolat B51 dans le système biphasique dans le temps.....	77
Figure 12 : Localisation de l'isolat B21 dans le système biphasique dans le temps.....	80
Figure 13 : Localisation de l'isolat B44 dans le système biphasique dans le temps.....	81
Figure 14 : Effet du PYR et du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51...	83



**1**  
***Introduction***

Depuis plusieurs décennies, l'intense activité industrielle a entraîné la production de différents composés en quantités abondantes pour répondre à de nouveaux besoins, tels que la fabrication d'insecticides, d'isolants, d'agents de préservation, etc. Dans certains cas, l'apparition de fortes quantités de ces composés a débalancé l'équilibre de la nature, l'atténuation naturelle étant trop faible en comparaison avec les quantités libérées dans l'environnement, ce qui a occasionné d'importants problèmes de pollution. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont connu une accumulation dans l'environnement entraînant la contamination de nombreux sites. Ces molécules très hydrophobes, comportant un minimum de deux cycles aromatiques, peuvent provenir de source anthropique ou naturelle. Les HAP sont des produits obtenus lors de la combustion incomplète de la matière organique. Ils sont libérés lors de phénomènes naturels, tels que les feux de forêt, les éruptions volcaniques, etc. Cependant, de nos jours, l'emploi du pétrole et de ses dérivés sont les sources majeures de libération des HAP dans l'environnement, que ce soit par déversement ou par combustion incomplète. Les HAP sont aussi présents en proportion importante dans la créosote, un produit de la distillation du pétrole grandement utilisé pour la préservation du bois et responsable de nombreux cas de pollution.

Les sites pollués par les HAP ont habituellement un historique de contamination remontant à plusieurs décennies. La persistance des HAP dans l'environnement s'explique principalement par leur faible biodisponibilité (Guerin, 2000). La biodisponibilité reflète la facilité d'accès qu'ont les organismes vivants à une molécule, c'est-à-dire si cette dernière est inaccessible (trappée dans un liquide, adsorbée sur une surface) ou accessible aux organismes. La biodisponibilité d'une molécule est généralement inversement proportionnelle à son hydrophobicité, ce qui contribue à expliquer la faible biodisponibilité des HAP. Les HAP de haut poids moléculaire (HPM) sont encore moins biodisponibles que ceux de faible poids moléculaire (FPM) et, pour cette raison, ils persistent davantage dans l'environnement.

Des études ont démontré que les HAP possèdent des propriétés mutagènes, tératogènes et cancérigènes et que des risques pour la santé sont encourus lors de l'exposition des animaux et des humains à ces composés (Keith et Telliard, 1979, Kaden, Hites et Thilly, 1979). Devant le fait accompli, l'élimination de la pollution est devenue un enjeu majeur au cours des dernières années, ceci résultant principalement de la sensibilisation du public à cette problématique. Pour parvenir à la diminution sous un seuil acceptable des concentrations de HAP de l'environnement, plusieurs mesures correctives sont disponibles, dont les méthodes physico-chimiques (adsorption, extraction, oxydation, etc), thermiques (incinération) et biologiques. Les méthodes biologiques de

dépollution (aussi désignées par le terme biorestauration) reposent habituellement sur l'action de plantes ou de microorganismes (bactéries et champignons). Contrairement aux méthodes physico-chimiques et thermiques, elles ont l'avantage d'être peu coûteuses et non polluantes. Utilisées surtout depuis la fin des années 1980, les méthodes biologiques ne sont pas parfaitement développées, mais elles offrent un grand potentiel. Leur sous-utilisation est grandement liée au fait que leurs performances relèvent d'organismes qui sont influencés par de nombreux paramètres (conditions de croissance, présence et expression des voies métaboliques de dégradation, etc). L'optimisation de ces paramètres peut s'avérer ardue, particulièrement en absence d'information sur les organismes effectuant la transformation et/ou la dégradation des polluants. Le succès de la biorestauration passe donc par l'acquisition de connaissances fondamentales supplémentaires.

Plusieurs techniques de biorestauration ont été développées, par exemple les biopiles, le compostage, divers types de bioréacteurs, mais peu permettent d'accroître la biodisponibilité de polluants comme les HAP. Les systèmes biphasiques (ou cultures à deux phases liquides) possèdent cependant cet avantage. Ces cultures sont constituées d'une phase aqueuse, de même que d'une phase hydrophobe composée d'un solvant non miscible à la phase aqueuse et non biodégradable. Ce solvant permet une solubilisation des HAP de l'ordre de  $10^4$  fois supérieure à la phase aqueuse. La biodégradation peut s'effectuer dans la phase aqueuse et/ou à l'interface des deux phases liquides. Les HAP devraient donc être plus biodisponibles dans un système biphasique que dans un bioréacteur conventionnel, permettant ainsi d'observer de meilleures cinétiques de dégradation dans ce type de système et ce, pour plusieurs composés hydrophobes (HAP, styrène, xylène, phénols, chlorophénols, hexadécane, biphényle, etc) (Déziel, Comeau et Villemur, 1999).

En règle générale, les microorganismes agissent sous forme de communautés, aussi appelées consortia, lorsque des interactions essentielles à leurs activités surviennent entre les membres. Quelques consortia dégradant les HAP ont été décrits dans la littérature (Mueller, Chapman et Pritchard, 1989, Tagger, Truffaut et Le Petit, 1990, Juhasz, Britz et Stanley, 1997a, Marcoux, 1998). Généralement, les connaissances concernant les microorganismes impliqués et leurs interrelations sont très limitées. Le consortium obtenu par Marcoux (1998) a été enrichi dans des cultures biphasiques. Cet auteur a étudié l'effet de l'addition d'agents tensioactifs, d'agents inducteurs des voies métaboliques et de HAP FPM sur les cinétiques de dégradation de cinq HAP en système biphasique. Marcoux (1998) a démontré que, dans les conditions utilisées, au moins

trois des HAP étudiés (le phénanthrène (PHE), le pyrène (PYR) et le chrysène (CHY)) étaient minéralisés.

Le consortium isolé par Marcoux (1998) a constitué le point de départ de la présente étude. Le but de ce projet était d'étudier et de caractériser un consortium de microorganismes dégradant des HAP HPM dans un système biphasique. Les objectifs spécifiques étaient les suivants : 1) optimiser la dégradation des HAP par le consortium, en variant certains paramètres tels que les mélanges de HAP et certaines propriétés physiques des cultures, 2) isoler des souches dominantes du consortium et 3) caractériser sommairement les microorganismes dégradeurs de HAP. L'étude devait permettre de comprendre les phénomènes survenant lors de la dégradation d'une mixture de HAP par un consortium de microorganismes. La complexité et la variabilité dans le temps des microorganismes composant le consortium nous ont incité à isoler les microorganismes dégradeurs de HAP, de manière à les étudier individuellement dans le système biphasique. Plusieurs microorganismes isolés ont été caractérisés (morphologie, coloration de Gram, production de biosurfactants, spectre de dégradation en présence de différentes combinaisons de HAP, séquence de dégradation des HAP et performances de dégradation dans différents milieux, localisation de la biomasse dans le système biphasique, etc). Une meilleure compréhension du comportement des microorganismes en système biphasique devrait éventuellement permettre l'application de ce procédé à la restauration de sites ou d'effluents contaminés par les HAP ou autres substances peu solubles en milieu aqueux.

2  
*Revue de littérature*



## **2.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques**

### **2.1.1 Réglementation**

Lors du siècle dernier, de nombreuses molécules ont été synthétisées par l'homme et ont ainsi fait leur apparition dans l'environnement. Ces molécules sont appelées xénobiotiques. On pourrait citer l'exemple bien connu des biphényles polychlorés (BPC), du pentachlorophénol (PCP), etc. D'autres substances, naturellement présentes dans l'environnement, ont quant à elles connu une utilisation extensive, ce qui en a généré des quantités très importantes, qui ont ensuite été rejetées dans l'environnement avec plus ou moins de contrôle. C'est le cas des HAP. Les propriétés génotoxiques des HAP ont conduit à l'établissement de normes environnementales pour ces produits. Depuis 1976, les HAP font partie de la liste des 16 polluants prioritaires de l'Agence de Protection Environnementale américaine (EPA) (Keith et Telliard, 1979). Le Québec a aussi une législation à ce sujet, où 14 HAP sont réglementés dans les eaux et 22 dans les sols (Ministère de l'Environnement du Québec, 1999).

Selon cette dernière réglementation, un site peut être classé parmi trois plages de contamination, où la plage A équivaut à une absence de contamination, la B désigne un site faiblement contaminé et la C, un site contaminé, pouvant nécessiter des procédures de décontamination. À ce niveau, l'eau est impropre à la consommation et les sols ne peuvent qu'être affectés à des usages industriels ou commerciaux, et non à des fins agricoles, résidentielles ou récréatives (Ministère de l'Environnement du Québec, 1999).

### **2.1.2 Origine des HAP**

Les HAP résultent d'une combustion incomplète de matériel organique et sont des constituants présents naturellement dans les combustibles fossiles. Ils sont donc largement retrouvés dans les produits issus du raffinage des combustibles fossiles (charbon, essence, diésel, bitume), mais le sont aussi dans les sites ayant été utilisés pour le transport ou la distribution de tels produits, dû à des déversements accidentels ou à de la négligence (Cerniglia, 1992, Langworthy et al., 1998). Les HAP sont aussi retrouvés en forte proportion dans la créosote, constituée à 85% de HAP, qui a été fortement utilisée dans les industries de traitement du bois. Ces dernières ont été, dans le passé, des sources importantes de contamination par les HAP, laissant encore de nos jours un héritage préoccupant. On note aussi que les HAP peuvent provenir de tout processus de combustion naturel (incendies forestiers, éruptions volcaniques, etc), ainsi que de la fumée de cigarette (Dean-Ross et Cerniglia, 1996). Les HAP sont détectés dans presque tous les environnements possibles : air, sol et sédiments, eau de surface, eau profonde, sur la végétation et

sur les aliments (Grifoll et al., 1992, Kanaly et al., 2000). Le transport des HAP par voie atmosphérique et par voie aqueuse contribue à leur large dispersion dans l'environnement (Bouchez et al., 1996a). Les HAP sont donc des molécules ubiquitaires.

### 2.1.3 Structure des HAP

Les HAP sont constitués d'au minimum deux cycles aromatiques, formés d'atomes de carbone et d'hydrogène. Ils sont divisés en deux groupes, selon le nombre de cycles qu'ils possèdent. Les HAP FPM comptent 2 ou 3 cycles, tandis que les HPM comportent 4 cycles et plus. La présence d'un cycle aromatique à cinq carbones peut aussi être notée. Les composés polyaromatiques hétérocycliques (dont au moins un cycle possède un atome de S, de N ou d'O) ou substitués sont souvent aussi classés parmi les HAP.

Le patron de fusion des cycles peut être linéaire, angulaire ou groupé. On dénote, en tendances générales, que plus le nombre de cycles des HAP est élevé, plus leur volatilité et leur solubilité dans l'eau sont faibles. Cette faible solubilité a l'avantage de limiter le déplacement des HAP, mais contribue fortement à la persistance de ceux-ci dans l'environnement en les rendant inaccessibles (Shuttleworth et Cerniglia, 1995). Les HAP possèdent aussi une grande résonance moléculaire, leur conférant une stabilité thermodynamique (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991). Les propriétés chimiques de chaque HAP dépendent principalement du poids moléculaire et du patron de fusion des cycles de la molécule (Kanaly et Harayama, 2000).

### 2.1.4 Risques des HAP sur la santé

Dû à leur nature liposoluble, les HAP ont un haut potentiel de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire (Kanaly et Harayama, 2000). Varanasi et Stein (1991), ainsi que Mueller et al. (1991), ont aussi remarqué que de nombreux HAP avaient des effets sur la reproduction et la mortalité des animaux aquatiques. Les HAP exercent, dans certains cas, des effets toxiques et/ou présentent des propriétés mutagènes, tératogènes, cancérigènes (Keith et Telliard, 1979, Kaden, Hites et Thilly, 1979) ou précarcinogènes (requièrent une activation métabolique afin de pouvoir se lier à l'ADN, l'ARN ou aux protéines et ainsi causer leurs effets néfastes (Sutherland et al., 1995)) ou encore immunotoxiques, résumées par Bouchez et al. (1996a). Selon ces derniers auteurs, la corrélation entre pouvoir mutagène et cancérigène des HAP est forte. On note que la mutagénicité de ces molécules augmente avec leur masse moléculaire (Dean-Ross et Cerniglia, 1996). Kramers et Van Der Heijden (1988) ont apporté des évidences voulant que certains HAP puissent être plus néfastes pour la santé lorsque présents en combinaison que la somme théorique des effets des

HAP seuls. Certains auteurs (Kotterman et al., 1998b, Juhasz, Stanley et Britz, 2000) ont observé que la mutagénicité des intermédiaires de dégradation des HAP était inférieure à celle du produit original, alors que d'autres ont observé le phénomène inverse (Sutherland, 1992, Shuttleworth et Cerniglia, 1995). Enfin, la forme sous laquelle un HAP se retrouve peut influencer l'effet toxique qu'il exerce sur les microorganismes, comme dans le cas du naphthalène (NAP), qui s'avère souvent toxique lorsqu'il est fourni directement dans le milieu, mais dont la toxicité est nettement réduite lorsqu'il est fourni sous forme de vapeurs (Mueller et al., 1990, Weissenfels et al., 1991).

## **2.2 Biodégradabilité et traitement des HAP**

### **2.2.1 Persistance des HAP dans l'environnement**

De par leur structure peu encline à la biodégradation, les HAP tendent à persister dans l'environnement. Les sites contaminés aux HAP peuvent contenir quelques milliers de parties par million (ppm), par rapport à un bruit de fond de moins d'une dizaine de parties par milliard (ppb) pour une région peu développée (Cerniglia, 1992, Schneider et al., 1996). On observe que les HAP comportant un faible nombre de cycles aromatiques ont une demi-vie beaucoup plus courte que ceux comportant quatre, cinq et six cycles (Bossert et Bartha, 1986, Heitkamp et Cerniglia, 1987, Shuttleworth et Cerniglia, 1995). De plus, les HAP les plus hydrophobes ont tendance à s'adsorber avec les sédiments (dans les plans d'eau) ou avec le sol (dans l'environnement terrestre), ce qui les rend beaucoup moins biodisponibles, c'est-à-dire moins accessibles aux microorganismes (Cerniglia, 1992). L'adsorption limite la répartition des HAP entre les phases solide, aqueuse et gazeuse et diminue ainsi les possibilités de biodégradation, mais réduit à la fois la toxicité liée aux HAP.

L'adsorption des HAP sur le sol, aussi appelée humification, se produit d'abord rapidement entre les HAP et la surface externe des particules de sol et est réversible. Puis, les HAP partitionnent dans les régions internes des particules (Guerin, 2000). À ce stade, l'adsorption est irréversible, les HAP et leurs métabolites subissent des modifications (dont des oxydations), pour former des macromolécules non hydrolysables, ressemblant à de l'humus (Kästner et al., 1999). Les propriétés structurales et chimiques du sol, ainsi que celles des polluants, affectent leur degré d'adsorption, de même que le temps de contact entre ceux-ci et les particules de sol (Head, 1998, Tang et al., 1998). Kästner et al. ont quant à eux démontré en 1999 que l'ajout de compost n'influençait pas le degré d'humification des HAP, et donc que la concentration en carbone organique d'un sol n'avait pas autant d'importance que mentionné par plusieurs auteurs (Manilal et Alexander, 1991, Richnow et al., 1995). Selon Löser et al. (1999), les microporosités du sol

auraient plus d'importance que son contenu en carbone organique. Finalement, Tang et al. (1998) ont émis l'hypothèse que la non disponibilité des HAP puisse être relative d'un organisme à l'autre, c'est-à-dire qu'une certaine portion des HAP puisse redevenir disponible pour un organisme, suite à leur solubilisation par des enzymes par exemple.

Le faible taux de dissolution des HAP dans l'eau et leur séquestration dans des liquides hydrophobes peuvent aussi influencer leur biodisponibilité (Efroymsen et Alexander, 1994). La faible biodisponibilité des HAP est le facteur principal limitant leur biodégradation et est influencée directement par leur hydrophobicité, les HAP HPM étant en général moins biodisponibles que les FPM (Guerin, 2000). Enfin, des facteurs tels que la température, le pH, la disponibilité de l'oxygène et des nutriments, la salinité, le type de sol, les pourcentages de matière organique et d'humidité influencent aussi la dégradation des HAP dans l'environnement (Mueller, Chapman et Pritchard, 1989), de même que la concentration à laquelle ces derniers sont retrouvés et leur répartition dans une mixture de HAP (Kelley et Cerniglia, 1995), la présence ou l'absence de molécules induisant leur biodégradation (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995a) ainsi que la présence de substances toxiques envers les microorganismes sur le site de la contamination (Weissenfels et al., 1991).

### 2.2.2 Contamination par un mélange de HAP

Lors d'une contamination, les HAP sont habituellement retrouvés en mélange, dû au fait que leur utilisation requerrait leur présence sous forme de mixture (par exemple, la créosote). La concentration d'un HAP particulier dans une mixture dépend de la source de l'échantillon (Bouchez et al., 1996a) et de la susceptibilité de ce HAP à l'attaque microbienne et aux dégradations abiotiques (Mueller et al., 1991). La présence des HAP sous forme de mélange plutôt que sous forme individuelle influence leur dégradation. En effet, plusieurs auteurs ont observé qu'un HAP pouvait influencer la dégradation des autres HAP avec lesquels il se trouvait (Bauer et Capone, 1988, Park, Sims et Dupont, 1990, Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995a, Kelley et Cerniglia, 1995). Des interactions positives comme négatives ont été notées (voir section 2.4.2.5). Selon Kazunga et Aitken (2000), la présence des HAP en mélange favoriserait l'enrichissement de souches possédant des capacités métaboliques versatiles. D'autres substances polluantes présentes en mélange avec les HAP peuvent aussi influencer leur biodégradation (Uraizee, Venosa et Suidan, 1998). Selon une étude de Lantz et al. (1997), les composés hétérocycliques, phénoliques (incluant le PCP) et les HAP joueraient, dans cet ordre, un effet de toxicité/inhibition sur les cellules, l'effet étant relié à leur concentration.

### 2.2.3 Contamination par des produits dérivés des HAP

La biodégradation des HAP méthylés ou possédant des chaînes alkyles a été moins étudiée que celle des HAP, mais semble possible (Stringfellow et Aitken, 1995a, Dutta, Selifonov et Gunsalus, 1998, Sabaté et al., 1999, Meyer et Steinhart, 2000). La nature de la chaîne alkyle, de même que la position de cette dernière, exerce un effet marqué sur le site d'attaque enzymatique et la voie métabolique suivie (Tongpim et Pickard, 1996, Dutta, Selifonov et Gunsalus, 1998). Selon ces derniers, les enzymes impliquées, du moins lors des premières étapes de dégradation, seraient peu spécifiques puisqu'elles permettraient à la fois la dégradation du HAP non méthylé et méthylé. Tongpim et Pickard (1996) ont quant à eux observé que la présence d'un HAP méthylé pouvait inhiber la dégradation du même HAP non méthylé, sans toutefois pouvoir expliquer cette observation. Selon Bouchez et al. (1996a), certains HAP méthylés peuvent être parfois plus mutagènes et cancérigènes que les HAP parents.

Les cétones polycycliques aromatiques et les quinones, intermédiaires de dégradation oxygénés des HAP générés par des réactions d'oxydation non spécifiques, sont aussi grandement répandus dans l'environnement et leur toxicité a été démontrée (Fernandez et al., 1992). Ces composés ont souvent une plus grande persistance dans l'environnement que les composés originaux (Kästner et al., 1999). Selon Casellas et al. (1998), leur biodégradation pourrait nécessiter un système enzymatique très spécifique.

### 2.2.4 Traitements de dépollution

De nombreux phénomènes naturels contribuent à la disparition des HAP de l'environnement : la volatilisation, l'adsorption à la matière organique, l'oxydation chimique, la photo-oxydation et la bioaccumulation (Cerniglia, 1992). Cependant, ces phénomènes d'atténuation naturelle ne sont pas suffisants à eux seuls pour réaliser une dégradation marquée des HAP, particulièrement des HPM. On doit donc avoir recours à des méthodes physico-chimiques, thermiques ou biologiques pour mener à terme la dépollution complète, rapide et sécuritaire des sites pollués.

#### 2.2.4.1 Traitements physico-chimiques et thermiques

De nombreuses méthodes physico-chimiques et thermiques s'avèrent efficaces pour la restauration des sites pollués aux HAP. Le plus grand avantage de ces traitements est que leur issue est prévisible. Cependant, ces technologies présentent aussi de nombreux inconvénients. Par exemple, les méthodes physico-chimiques ne permettent souvent que d'extraire, d'adsorber ou de concentrer les contaminants, ce qui ne constitue qu'un déplacement de ceux-ci et non une

éradication du problème. Quant aux méthodes thermiques, elles impliquent la destruction des sols (incinération de la matière organique), nécessitent des coûts d'opération élevés et peuvent générer des émanations toxiques (Benachenhou, 1998), ce qui en fait des méthodes peu souhaitables, particulièrement si l'on désire réhabiliter les sols traités.

#### 2.2.4.2 Traitements biologiques

Le traitement de sites pollués par voie biologique, ou biorestauration, consiste en l'utilisation de microorganismes (flore indigène ou exogène) pour dégrader les composés polluants en produits simples et non toxiques ( $H_2O$ ,  $CO_2$  et biomasse) (Atlas et Cerniglia, 1995). La biorestauration est l'une des techniques les plus abordables pour traiter les sols contaminés avec des composés dérivés du pétrole (Chaineau, Morel et Oudot, 1995) et est bien perçue par la population. À l'inverse des traitements physico-chimiques et thermiques, il est difficile de prévoir l'issue des traitements biologiques, de par un manque de connaissances à la fois des comportements des microorganismes dans leur environnement naturel et de leurs interactions avec les facteurs physiques, chimiques et biologiques qui les entourent.

Deux approches de traitements biologiques peuvent être envisagées : la biostimulation et la bioaugmentation. La biostimulation vise à augmenter l'activité des populations indigènes par l'ajout de nutriments, d'un accepteur terminal d'électrons ou d'un composé induisant la dégradation (voir section 2.4.2.5), afin de stimuler les populations déjà présentes sur le site. Les nutriments les plus souvent ajoutés sont des sources d'azote et de phosphore. Des sources de carbone ne sont que rarement ajoutées, sauf dans les cas où la concentration en carbone présente n'est pas suffisante pour supporter une population microbienne active. Enfin, plusieurs considérations doivent être tenues en compte lorsque l'on détermine la quantité et le type de nutriments à ajouter, afin de maintenir les conditions du milieu optimales, notamment afin de ne pas influencer le potentiel redox du milieu et de ne pas favoriser la croissance d'une population ne dégradant pas le composé polluant visé (Liebeg et Cutright, 1999).

Le premier exemple de biostimulation réussie à grande échelle est survenu suite au déversement pétrolier de l'*Exxon Valdez*, en 1989. Dans ce cas, l'ajout de nutriments sur plus de 70 miles de plage a permis d'accélérer la dégradation du pétrole de 3 à 5 fois (Atlas et Cerniglia, 1995). Parmi les exemples de biostimulation réussie, à petite échelle cette fois, citons les études d'Aislabe, McLeod et Fraser (1998), de Zaidi et Imam (1999), ainsi que de Guerin (2000). Ce dernier, après avoir augmenté le contenu en matière organique du sol et avoir ajouté des sources d'azote et de

phosphore, remarqua une dégradation de plus de 50 % des HAP HPM benz[*a*]anthracène (BAA), benzo[*a*]pyrène (BAP), dibenz[*a,h*]anthracène (DBA), benzo[*b,k*]fluoranthène (BKF), benz[*g,h,i*]pérylène (BGP) et CHY par compostage, en sept mois. Kästner et al. (1999) ont eux aussi obtenu une plus grande minéralisation de l'anthracène (ANT) en présence de compost. Dans l'étude de Kirchmann et Ewnetu (1998), l'ajout périodique de compost fut cependant nécessaire car celui-ci était dégradé plus rapidement que les résidus pétroliers visés. Au terme de cette étude, la concentration des HAP HPM était réduite d'un facteur 10.

La bioaugmentation, quant à elle, consiste en l'ajout de souches microbiennes indigènes ou exogènes (non présentes naturellement dans le site), dans le but d'optimiser l'activité microbienne de ce dernier (Liebeg et Cutright, 1999). La réintroduction dans le sol de microorganismes isolés pour leurs capacités à dégrader les HAP a conduit à des résultats positifs de biorestauration (à petite échelle) (Kelley et Cerniglia, 1991, Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991 et 1995, Boonchan, Britz et Stanley, 1998) mais, dans d'autres cas, aucun effet ne fut remarqué (Goldstein, Mallory et Alexander, 1985). Enfin, quelques études ont combiné à la fois bioaugmentation et biostimulation. Dans les études de Grosser, Warshawsky et Vestal (1991) et de Kanaly et al. (1997), les meilleurs rendements de dégradation du BAP ont été obtenus en présence de sol (ou de sédiments), contaminé ou non, contenant une flore microbienne indigène.

Selon Munro et Daugulis (1996), tout xénobiotique est biodégradable, à condition d'avoir les conditions appropriées. L'échec de la biostimulation et de la bioaugmentation peut être imputé à de nombreuses raisons, notamment à la trop faible quantité de nutriments pour la quantité de microorganismes présents (Hughes et al., 1997), à la trop faible concentration du polluant pour supporter la croissance de l'inoculum (Singleton, 1994), à la distribution hétérogène des polluants (Head, 1998), à la faible compétitivité des microorganismes exogènes avec la flore indigène du sol (Atlas, 1977), à la susceptibilité des microorganismes exogènes aux autres contaminants présents (Singleton, 1994), à la présence d'une quantité significative de microorganismes dégradant les HAP avant la bioaugmentation (de sorte que l'ajout de microorganismes supplémentaires dégradant les HAP ne cause pas d'effets notables) (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1995), à un trop petit inoculum ajouté (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991) ou encore à un mauvais contact entre les microorganismes inoculés et les polluants ou nutriments (Liebeg et Cutright, 1999). Finalement, chaque cas de bioaugmentation ou de biostimulation est spécifique à un site donné car il implique des microorganismes et un environnement différents d'une fois à l'autre. L'implantation réussie d'un nutriment ou d'un microorganisme dans un site ne garantit pas un

succès équivalent dans un type de sol différent, avec un microorganisme différent ou avec un polluant différent (Liebeg et Cutright, 1999).

Enfin, il est important de noter que la quantité de microorganismes et leur niveau d'activité dans un sol ne sont pas nécessairement des indicateurs fiables de leur potentiel de dégradation des HAP car des facteurs additionnels, comme la biodisponibilité des polluants et la sélection de populations adaptées, doivent être considérés (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991). Avant d'amorcer un traitement de dépollution, il faut donc évaluer le potentiel de chaque site pour la dégradation des HAP, et non pas seulement évaluer la biomasse du site ou son niveau de viabilité.

### **2.3 Microorganismes métabolisant les HAP**

La littérature rapporte des centaines de microorganismes capables de dégrader, partiellement ou complètement, les HAP ou de les cométaboliser. Les microorganismes impliqués dans la dégradation des HAP peuvent être des algues, surtout répertoriées pour leur capacité de dégradation des HAP FPM (Cerniglia, Gibson et Van Baalen, 1980). Les champignons présentent aussi des caractéristiques intéressantes pour la biodégradation des HAP : leurs hyphes peuvent pénétrer des agrégats de sol anoxiques, le déplacement des hyphes dans le sol n'est pas restreint par des environnements hydrophobes, les champignons sont souvent xéro- et osmotolérant et ils sécrètent de nombreuses enzymes extracellulaires, contrant la faible biodisponibilité des HAP. Cependant, ils dégradent les HAP à des taux plus lents et de façon généralement moins complète que les bactéries (April, Foght et Currah, 2000). Finalement, on estime que la très grande majorité des phénomènes de biodégradation des HAP est due aux bactéries (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1995, Bouchez et al., 1996b, Tadros et Hughes, 1997, Aislabie, McLeod et Fraser, 1998).

#### **2.3.1 Adaptation des microorganismes à une contamination**

Il fut prouvé que la proportion de microorganismes dégradant les HAP augmente de façon très importante suite à une contamination, suivant un processus d'enrichissement naturel (Song et Bartha, 1990, Atlas et Cerniglia, 1995, Langworthy et al., 1998, MacNaughton et al., 1999). Cela suggère une adaptation des populations au stress du milieu. De ce fait, les communautés microbiennes présentes dans des écosystèmes pollués sont habituellement dominées par les organismes capables d'utiliser les polluants ou de survivre en leur présence. En conséquence, ces communautés sont souvent moins diverses que celles présentes dans des écosystèmes non pollués, malgré que leur diversité puisse être influencée par la complexité des mixtures chimiques avec lesquelles elles sont en contact et la durée du temps d'exposition (MacNaughton et al.,



1999). Enfin, il fut observé par Sotsky, Greer et Atlas (1994) et par Guerin (2000) que les populations microbiennes pouvaient évoluer au fil de la contamination, dans un site donné, en fonction des changements de la composition chimique des hydrocarbures présents. Dans un article datant de 1998, Head, Saunders et Pickup ont résumé les techniques de biologie moléculaire pouvant servir à mesurer la composition de communautés microbiennes et à étudier la dynamique de ces populations dans le temps, un champ de l'écologie microbienne en plein essor. Gamo et Shoji (1999) ont aussi proposé une méthode basée sur l'énumération par le nombre le plus probable (MPN) pour mesurer quantitativement les diverses populations présentes au fil du temps dans une communauté microbienne. Thomas et al. (2000) ont quant à eux mis au point une méthode de dénombrement basée sur l'utilisation de la cytométrie en flux.

Certains auteurs ont documenté l'apparition de chaînes alimentaires dans les sédiments ou l'eau profonde d'estuaires, dans lesquelles les microorganismes dégradant les HAP augmentent en nombre lors d'une contamination et servent alors de nourriture pour des microeucaryotes prédateurs, dont la population augmente alors aussi (Carman et al., 1995, Langworthy et al., 1998). Selon ces auteurs, c'est toute la chaîne alimentaire qui peut donc être affectée par une contamination.

### 2.3.2 Ubiquité des microorganismes dégradant les HAP

#### 2.3.2.1 Bactéries

Il fut longtemps cru que seuls les sols possédant un historique de contamination par les HAP renfermaient des microorganismes capables de dégrader ces molécules. Kästner, Breuer-Jammali et Mahro (1994) ont prouvé que tous les sols qu'ils ont examinés (contaminés ou non par des HAP) renfermaient une importante flore indigène ( $> 10^4$  unité formatrice de colonie (UFC)/gramme de sol) capable de dégrader le NAP, résultat obtenu à nouveau par Bouchez et al. (1995b) et par Daly et al. (1997). Dans ces deux dernières études, plusieurs bactéries capables de dégrader l'ANT, le PHE, le PYR et le fluoranthène (FLA) ont aussi été détectées, mais uniquement dans les sols contaminés aux HAP. Les travaux de Kiyohara, Takisawa et Nagao, datant de 1992, démontrent que les bactéries dégradant le PHE sont encore plus largement distribuées dans l'environnement que celles dégradant le NAP et, qu'en plus, la majorité d'entre elles peuvent aussi dégrader d'autres HAP FPM, ainsi que des HAP HPM. Les auteurs expliquent ce résultat en mentionnant que leurs échantillons avaient été prélevés à proximité d'une ville et qu'ils avaient peut-être un historique de contamination aux HAP pour cette raison. Si l'on compare les résultats de Kiyohara, Takisawa et Nagao (1992) à ceux de Kästner, Breuer-Jammali

et Mahro (1994), on peut supposer que, puisque le NAP est plus volatil et plus facilement dégradé que le PHE, il se retrouve à des niveaux plus faibles dans l'environnement que le PHE, et qu'il exerce donc ainsi une plus faible pression sélective sur les bactéries. Selon Mueller et al. (1997), les bactéries métabolisant les HAP HPM ne sont présentes en quantité importante que dans les sols contaminés par ceux-ci. Selon eux, la faible quantité de bactéries dégradant les HAP dans un site peut aussi être corrélée au caractère récent de la pollution et, donc, à un manque d'adaptation. De plus, les sols contenant une plus forte quantité de HAP contiennent habituellement plus de microorganismes dégradeurs que les sols faiblement contaminés (Cerniglia, 1993). Finalement, on note la plus faible présence dans l'environnement de souches dégradant les HAP HPM que celles dégradant les HAP FPM (Kiyohara, Takisawa et Nagao, 1992).

De nombreuses bactéries marines capables de dégrader les HAP ont aussi été isolées (Gauthier et al., 1992, Hedlund et al., 1999). Quelques études ont démontré que des isolats provenant de sites géographiquement distincts étaient très reliés phylogénétiquement (Fuhrman, McCallun et Davis, 1993, Garcia-Pichel, Prufert-Bebout et Muyzer, 1996, Geiselbrecht et al., 1998). Enfin, Stapleton et al. (1998) et Annweiler et al. (2000) ont isolé des bactéries dégradant le NAP d'un sol à pH 2 et croissant à 60°C, respectivement, ce qui démontre que la biodégradation de HAP peut survenir dans des environnements extrêmes. Finalement, Aislabie, McLeod et Fraser (1998) ont prouvé la présence de microorganismes dégradant les HAP en Antartique, ce qui confirme leur ubiquité.

Les diverses techniques expérimentales pouvant être utilisées pour repérer la présence de bactéries dégradant les HAP dans le sol ont été résumées par Sanseverino et al. (1993b). Il peut s'agir de comptes sur géloses, d'hybridation de colonies ou d'ADN, de détection par luminescence ou fluorescence, d'amplification de l'ADN ou de l'ARNm par PCR, etc. Ces méthodes peuvent par contre être limitées par leur sensibilité, leur faible applicabilité à des populations mixtes ou non définies, leur faible représentativité de la flore totale dégradant les HAP, leurs limites expérimentales (faible taux de rendement des étapes expérimentales, faible reproductibilité), etc.

#### 2.3.2.2 Champignons

Les champignons dégradant les HAP sont aussi retrouvés dans une gamme très vaste d'environnements, étant la plupart du temps isolés à partir de sites contaminés ou de matière organique en décomposition (litière de forêt, bois ou aiguilles de conifères en décomposition, etc) (Field et al., 1992).

### 2.3.3 Bactéries dégradant les HAP

Une variété impressionnante de bactéries dégradant les HAP a été décrite dans la littérature, les genres les plus fréquemment rencontrés dans le sol étant *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Alcaligenes*, *Gordona*, *Flavobacterium* et *Acinetobacter* (Bouchez et al., 1996b). Dans les environnements marins, on note, entre autres, les genres *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oceanospirillum* et *Vibrio* (Gauthier et al., 1992, Geiselbrecht et al., 1998).

Les bactéries peuvent posséder un spectre de dégradation des HAP restreint (un seul HAP, Bouchez et al., 1995b, Tongpim et Pickard, 1996) ou très large (>5 HAP, Heitkamp et al., 1988a, Walter et al., 1991, Aitken et al., 1998). Il fut observé que les souches isolées sur le NAP ont des capacités de croissance larges sur les hydrocarbures monoaromatiques et sur les alcanes (Sotsky, Greer et Atlas, 1994). À l'opposé, les souches ayant été isolées sur des HAP à trois et quatre cycles présentent des capacités de croissance plus réduites sur les alcanes et les hydrocarbures monoaromatiques (Kästner, Breuer-Jammali et Mahro, 1994, Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995a). L'étude de Churchill, Harper et Churchill (1999) va cependant à l'encontre de cette affirmation. Enfin, plusieurs bactéries capables de transformer les sous-produits de dégradation des HAP ont été isolées (Kazunga et Aitken, 2000).

Si de nombreuses souches isolées se révèlent capables de dégrader une panoplie de HAP FPM (Gibson et al., 1975, Dean-Raymond et Bartha, 1975, Schocken et Gibson, 1984, Heitkamp et al., 1988a, 1988b, Foght et Westlake, 1988, Guerin et Jones, 1988, Ogunseitan et al., 1991, Grifoll et al., 1992 et 1994, Selifonov et al., 1993, Monna, Omori et Kodama, 1993, Sanseverino et al., 1993a, Trenz et al., 1994, Guerin et Boyd, 1995, Stringfellow et Aitken, 1995a, Dyksterhouse et al., 1995, Bouchez et al., 1995b, Goyal et Zylstra, 1996, Daly et al., 1997, Dagher et al., 1997, Tadros et Hughes, 1997, Aislabie, McLeod et Fraser, 1998, Manohar et Karegoudar, 1998, Geiselbrecht et al., 1998, Surovtseva, Ivoilov et Belyaev, 1999, Guerin, 2000), les bactéries dégradant et/ou minéralisant les HAP HPM sont quant à elles beaucoup moins courantes. Il fallu attendre la fin des années 80 avant de voir foisonner les articles à ce sujet.

#### 2.3.3.1 Historique de la découverte de bactéries dégradant les HAP HPM

En 1988, Heitkamp et al. (a, c) ont été les premiers à isoler une souche de *Mycobacterium* minéralisant le PYR, sans toutefois qu'elle puisse l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie. Cette souche dégradait le PYR plus rapidement que les HAP à deux et trois cycles et

minérialisait aussi le NAP, le PHE, le FLA, le 1-nitro-PYR et le 6-nitro-CHY. Il a été démontré en 1989 que cette mycobactérie améliorait aussi la minéralisation du BAP lorsqu'il faisait partie d'un mélange de HAP (Heitkamp et Cerniglia, 1989). Mahaffey, Gibson et Cerniglia (1988) ont montré pour la première fois qu'il y avait ouverture des cycles lors de la dégradation des HAP HPM, par le biais de l'étude d'une souche de *Beijerinckia* minéralisant le BAA. Enfin, cette même année, Foght et Westlake (1988) ont isolé une souche de *Pseudomonas* pouvant dégrader le FLA.

En 1989 et 1990, Mueller et al. ont démontré pour la première fois que l'utilisation comme seule source de carbone et d'énergie d'un HAP contenant quatre cycles aromatiques ou plus était possible, grâce à l'étude d'une souche dégradant le FLA. Cette souche de *Sphingomonas*, aussi étudiée par Ye et al. (1996), avait la caractéristique particulière de pouvoir dégrader le PYR, le BAA, le DBA, le CHY, le BAP et le benzo[b]fluoranthène (BBF) lorsque la culture était en phase stationnaire de croissance. En 1990, Weissenfels, Beyer et Klein ont isolé une souche d'*Alcaligenes* dégradant le FLA et cométabolisant le PYR et le BAA et Walter et al., en 1991, une souche de *Rhodococcus* utilisant soit le PHE, l'ANT, le FLA, le PYR ou le CHY comme seule source de carbone et d'énergie pour sa croissance. Toujours en 1991, Grosser, Warshawsky et Vestal ont découvert une mycobactérie utilisant le PYR comme seule source de carbone et d'énergie et pouvant aussi cométaboliser le BAA et le BAP, alors que Kelley et Cerniglia en ont isolé une autre dégradant le FLA.

En 1993, Boldrin, Tichm et Fritzsche ont purifié une souche capable d'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie le fluorène (FLU), le PHE, ainsi que le PYR, et de dégrader le FLA par cométabolisme. En 1994, Kästner, Breuer-Jammali et Mahro ont isolé deux souches pouvant utiliser le FLA et le PYR comme seules sources de carbone et d'énergie et, Cullen, Li et Reimer, deux autres dégradant à la fois le PHE et le PYR. En 1995, Bouchez et al. (b) ont obtenu en culture pure trois souches minéralisant le FLA et le PYR, ainsi que de nombreuses autres dégradant des HAP FPM, alors que Grosser, Warshawsky et Vestal ont isolé une mycobactérie dégradant l'ANT, le PHE et le PYR. En 1996, Jimenez et Bartha ont découvert une autre souche de *Mycobacterium* capable d'utiliser le PYR comme seule source de carbone et d'énergie et, Dean-Ross et Cerniglia, une souche semblable minéralisant de plus le PHE et le FLA. Enfin, Shuttleworth et Cerniglia ont obtenu deux isolats différents utilisant le PHE et le FLA comme seule source de carbone.

En 1997, Dagher et al. ont isolé deux souches dégradant le FLA et le BAA, dont l'une dégradait aussi le PYR, et Mueller et al. ont purifié une panoplie de souches dégradant efficacement le PHE et le FLA. Juhasz, Britz et Stanley (1997a) ont quant à eux obtenu trois souches de *Burkholderia* capables d'utiliser le FLU, le PHE, le FLA, le PYR, le BAA et jusqu'à 23% de DBA comme seule source de carbone et d'énergie. Il s'agissait de la première souche bactérienne capable de dégrader ce dernier composé. Cette même année, ces auteurs ont publié d'autres résultats sur l'une de leurs trois souches, affirmant qu'elle dégradait aussi le BAP (22%) et le coronène (COR) (55%), tant lorsque ces HAP étaient seuls que faisant partie d'un mélange (1997b). Il s'agissait du premier rapport d'une souche dégradant le COR.

En 1998, Aitken et al. ont isolé huit souches capables de métaboliser le CHY, le BAP et le BAA, alors que Boonchan, Britz et Stanley ont purifié une souche de *Stenotrophomonas* dégradant efficacement le PHE, le FLU, le PYR, le CHY, le BAP, le BAA et le DBA. En 1999, Churchill, Harper et Churchill ont découvert une mycobactérie minéralisant le PHE, le FLA et le PYR, aussi capable de dégrader une grande variété d'alcanes, et Molina, Araujo et Hodson, une souche minéralisant le PYR. Toujours en 1999, Samantha, Chakraborti et Jain ont obtenu quatre souches utilisant le PYR et le FLA pour leur croissance. Finalement, en 2000, Lainesse a isolé une souche de *Sphingomonas* minéralisant le CHY, ainsi que plusieurs autres HAP HPM. Ho et al. (2000) ont quant à eux purifié 28 souches dégradant le FLA, celles-ci cométabolisant presque toutes le FLU, l'ANT, le PYR, le BBF, le BAA et le BAP, ainsi que 21 autres souches utilisant le PYR et le FLA comme seule source de carbone et d'énergie.

#### 2.3.4 Champignons et algues dégradant les HAP

Les champignons dégradant les HAP les plus souvent cités dans la littérature appartiennent aux genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Trametes* et *Chrysosporium* (Bouchez et al., 1996b, April, Foght et Currah, 2000). Les champignons dits « lignolytiques », c'est-à-dire dégradant efficacement la lignine, effectuent leur attaque sur les HAP au moyen d'enzymes lignolytiques extracellulaires, habituellement des peroxydases, des laccases ou des oxydases (Kirk et Farrell, 1987). La sécrétion des enzymes est un mécanisme particulièrement avantageux dans le cas des HAP puisqu'elle permet de contrer en partie leur faible biodisponibilité, ces derniers n'ayant pas à être incorporés dans les cellules avant d'être dégradés (Kotterman et al., 1998a). La capacité de dégradation des HAP (et d'autres polluants) par ces enzymes est due à leur non-spécificité (Sanglard, Leisola et Fliechter, 1986). Il est à noter

que Sutherland (1992) a remarqué une inhibition de la croissance des champignons lorsqu'ils étaient en présence de HAP.

Les champignons non lignolytiques, quant à eux, démontrent peu de capacité à ouvrir les cycles des HAP (Hammel et al., 1992). Parmi ceux-ci, notons *Cunninghamella elegans*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus ochraceus*, qui procèdent à une transformation avancée des HAP (Bouchez et al., 1996b). Quant aux algues, Cerniglia, Gibson et Van Baalen (1980) ont observé que toutes celles testées présentaient une capacité d'attaque envers le NAP.

### 2.3.5 Consortium microbien

La biodégradation des HAP requiert souvent l'action simultanée de plus d'une souche microbienne, la variété de substrats présents demandant une microflore versatile et diverse pour parvenir à une dégradation extensive. De même, une action concertée des populations présentes peut aussi être requise pour la dégradation complète d'un seul HAP (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993). Enfin, un consortium microbien risque de bénéficier d'une plus grande résistance face à des composés toxiques qu'une culture pure (Marcoux, 1998).

En 1989, Mueller, Chapman et Pritchard ont obtenu un consortium composé de sept membres, capable de dégrader un très grand nombre de HAP présents en mixture, dont le FLA, l'ANT et le PYR. En 1991, cette même équipe a étudié la capacité de la flore microbienne indigène d'une eau contaminée aux HAP à dégrader ces derniers. Après 14 jours, 99% des HAP FPM et 53% des HAP HPM avaient été dégradés. En 1997 (a), Juhasz, Britz et Stanley rapportaient l'isolement de cinq communautés microbiennes capable d'utiliser le PYR comme seule source de carbone et d'énergie. Deux de ces communautés pouvaient aussi dégrader rapidement le PHE, le FLU et l'ANT et, moins rapidement, le FLA, le CHY, le BAA, le DBA et le BAP. Enfin, Marcoux et al. (1998, 2000) ont isolé un consortium microbien non défini capable de dégrader le PHE, le PYR, le CHY, le BAP et le pérylène (PER), dans un système biphasique (voir section 2.6).

En 1990, Tagger, Truffaut et Le Petit ont isolé une communauté de neuf souches, dont deux utilisant le NAP comme seule source de carbone, les sept autres utilisant les produits métaboliques intermédiaires. Dans cette communauté, les sept souches empêchaient l'accumulation d'intermédiaires de dégradation et étaient donc responsables du maintien de la dégradation. La concentration cellulaire de chacune des souches déterminait la concentration des intermédiaires de dégradation présents et, indirectement, la croissance des autres souches. En

1998, Casellas et al. ont aussi remarqué que la consommation par une souche d'un intermédiaire de dégradation, produit par une autre souche, permettait à la dégradation de s'effectuer. Autrement, la voie était engorgée et la dégradation ne se produisait pas jusqu'à la minéralisation. En 2000, Boonchan, Britz et Stanley ont quant à eux obtenu d'excellents résultats pour la croissance sur le BAP et sa minéralisation, en effectuant une coculture composée d'un champignon et d'un consortium bactérien ou, encore plus efficace, d'un champignon et d'une bactérie. Il semble que le champignon initiait la dégradation, ce qui rendait le BAP plus soluble et donc plus biodisponible pour la bactérie. Ce phénomène avait aussi été observé par Kotterman, Vis et Field (1998a). Notons que le champignon et la bactérie avaient été isolés de deux sites différents, ce qui signifie que la « minéralisation coopérative » n'est pas nécessairement limitée à des espèces ayant subi la même pression sélective. Les cocultures testées étaient de plus capables de croître en utilisant le DBA comme unique source de carbone.

En 1995, Trzesicka-Mlynarz et Ward ont obtenu une culture mixte dégradant efficacement le FLA et le BAP en présence de glucose, d'extrait de levure et de protéose peptone. La culture mixte pouvait aussi dégrader un mélange de HAP. Les quatre souches impliquées démontraient une meilleure dégradation des HAP en culture mixte que séparément. Selifonov et al. (1998), ainsi que Tadros et Hughes (1997), ont aussi noté la performance accrue des bactéries lorsque ces dernières étaient présentes en mélange. Cela signifie donc, entre autres, que les travaux en bioaugmentation devraient se concentrer sur l'addition de cultures mixtes aux sites contaminés et non pas de cultures pures, afin d'obtenir une plus grande efficacité.

### 2.3.6 Microorganismes anaérobies

Les avantages des traitements anaérobies par rapport aux traitements aérobies sont nombreux : ils sont moins coûteux (puisque les coûts reliés à l'oxygénation sont épargnés), il peut y avoir formation de méthane (un composé énergétique récupérable), ces traitements génèrent moins de boues biologiques (puisque moins de biomasse est formée) et les besoins en éléments nutritifs des microorganismes anaérobies sont moins importants (Guieysse et Mattiasson, 1999). Par contre, le temps de traitement s'avère habituellement plus long. Plusieurs auteurs ont observé la dégradation anaérobie réussie des HAP, particulièrement celle des FPM, en conditions méthanogènes, dénitrifiantes ou sulfatoréductrices (Mihelic et Luthy, 1988a, 1988b, Coates, Anderson et Lovley, 1996, Zhang et Young, 1997, Genthner et al., 1997, Rockne et Strand, 1998, Rockne et al., 2000, Guieysse et Mattiasson, 1999).

Malgré qu'un consortium microbien soit habituellement requis en anaérobie pour la dégradation des HAP, McNally, Mihelcic et Lueking (1998) ont isolé trois souches de *Pseudomonas* dégradant le NAP, l'ANT, le PHE et le PYR, à la fois en présence et en absence d'oxygène. En 2000, Rockne et al. ont aussi isolé deux souches pures (*Pseudomonas* et *Vibrio*) dégradant le NAP, lesquelles minéralisaient aussi ce composé. Il demeure cependant probable que la dégradation des HAP par ces souches soit plus efficace lorsqu'elles appartiennent à un consortium. En ce qui concerne les HAP HPM, peu de résultats positifs ont été obtenus en anaérobie. Mentionnons toutefois qu'en 1998, MacRae et Hall ont isolé un consortium anaérobie pouvant dégrader le PHE, l'ANT, le FLU, le FLA et le PYR, ainsi que le BAA et le CHY (très faiblement).

## **2.4 Voies de dégradation des HAP et enzymes impliquées**

### **2.4.1 Acquisition des HAP par les microorganismes**

La(Les) voie(s) d'acquisition des HAP par les microorganismes demeure(nt) à ce jour inconnue(s). En 1986, suite à leurs expériences, Bateman et al. proposèrent l'hypothèse que le NAP pénètre dans les cellules par diffusion simple. En 1998, Whitman, Lueking et Mihelcic reprirent les mêmes expériences mais conclurent plutôt que la présence d'un système de transport spécifique ATP dépendant était requise. Ils n'identifièrent cependant aucune des composantes de ce système.

La motilité bactérienne pourrait avoir un rôle à jouer dans l'acquisition des HAP. Dans cette optique, il est possible que les microorganismes se déplacent dans le sol par chimiotactisme. Marx et Aitken (1999) ont développé un modèle pour quantifier le chimiotactisme de *Pseudomonas putida* envers le NAP, mais peu d'études ont été effectuées sur le sujet. D'autres études seront nécessaires afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'acquisition des HAP et de déterminer si ces mécanismes sont les mêmes chez tous les microorganismes et pour tous les HAP.

### **2.4.2 Voies bactériennes de dégradation des HAP**

Malgré tous les travaux effectués dans le but d'élucider les voies métaboliques de dégradation des HAP, seules les voies du NAP, du PHE et de l'ANT sont complètement élucidées chez les bactéries (Cerniglia, 1992). De nombreux modèles de voies métaboliques ont cependant été proposés pour expliquer la dégradation des autres HAP (voir section 2.4.2.2). Tous les auteurs



s'accordent cependant pour affirmer que les produits de dégradation générés sont plus polaires que les molécules originales.

Les HAP peuvent être métabolisés entièrement, c'est-à-dire jusqu'à la minéralisation, accompagnée ou non de croissance, ou métabolisés seulement partiellement (Heitkamp, Franklin et Cerniglia, 1988b, Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991, Grifoll et al., 1995, Juhasz, Britz et Stanley, 1997a). On considère généralement que, chez les bactéries, l'attaque initiale des HAP se fait par l'intermédiaire d'une dioxygénase et conduit à la formation de *cis*-dihydrodiols (Cerniglia, 1993). Ceux-ci sont ensuite clivés par d'autres dioxygénases (Sutherland et al., 1995). Certains auteurs ont par contre observé quelques bactéries produisant des *trans*-dihydrodiols lors de la dégradation des HAP (Narro et al., 1992, Sutherland et al., 1990, Kelley, Freeman et Cerniglia, 1990, Heitkamp et al., 1988a, Tongpim et Pickard, 1999), ces produits pouvant dénoter l'implication d'une monoxygénase. Dans certains cas, les isomères *trans* ne subissaient pas de transformation subséquente (Heitkamp et al. 1988a). L'occurrence de mono- et dioxygénase chez une même bactérie a, de plus, déjà été démontrée (Kelley, Freeman et Cerniglia, 1990).

#### 2.4.2.1 Voies de dégradation du NAP

Le métabolisme du NAP a été étudié plus en détail que celui de n'importe quel autre HAP. La voie aérobie de dégradation du NAP la plus connue a été mise en évidence chez *Pseudomonas putida* PpG7 (Ensley et Gibson, 1983a). Cette voie du NAP, très conservée, implique deux tronçons métaboliques, les gènes étant localisés en opérons (opérons *nah* et *sal*) sur le plasmide NAH7 (Simon et al., 1993). Ces opérons peuvent être présents indépendamment l'un de l'autre (Guerin et Jones, 1988). La régulation des opérons *nah* et *sal* est contrôlée par le gène *nahR*, induit par le salicylate. L'opéron *nah* (gènes *nahA-F*) code pour les enzymes de la dégradation du NAP jusqu'à l'acide salicylique et l'opéron *sal* (gènes *nahG-M*) code pour les enzymes d'oxydation de l'acide salicylique en catéchol et pour celles réalisant l'ouverture de ce dernier composé (Bouchez et al., 1996b). Le catéchol constitue un intermédiaire classique de la dégradation des composés aromatiques et peut être dégradé par deux voies métaboliques, selon que le clivage est effectué en position *meta* ou *ortho*.

Ahn, Sanseverino et Saylor (1999) ont démontré que la majorité des bactéries dégradant les HAP qu'ils avaient isolées possédait des gènes apparentés à NAH7, 15% seulement n'hybridant pas avec la sonde *nahA*, résultats aussi obtenus par Sotsky, Greer, et Atlas (1994) et par Dagher et al. (1997). Ahn et al. expliquent ce résultat en émettant l'hypothèse que le transfert horizontal

(transmission de fragments d'ADN entre deux organismes non reliés phylogénétiquement) du plasmide NAH7 ait pu survenir entre les différentes bactéries du sol, contribuant à la dominance de ce génotype dans la flore indigène de sites contaminés aux HAP. Selon Leahy et Colwell (1990), l'effet du transfert horizontal serait encore beaucoup plus important; la diversité des microorganismes dégradant les HAP dans un site contaminé pourrait y être due. L'hypothèse du transfert horizontal a aussi été reprise par Stapleton et al. (1998), pour expliquer la présence de gènes de dégradation chez des bactéries acidophiles, ainsi que par Herrick et al. (1997). Ces derniers croient que la réponse d'adaptation des microorganismes aux HAP dans un site pollué puisse être due au transfert horizontal et que ce dernier ait été stimulé par la pression sélective due au contaminant. Le fait que des gènes de dégradation du NAP aient été retrouvés sur des plasmides transmissibles, des éléments génétiques mobiles, renforce l'hypothèse du transfert horizontal et explique pourquoi ces derniers ont été retrouvés sur des plasmides et sur le chromosome. Notons que des gènes de dégradation d'autres polluants ont aussi été associés avec des éléments transposables (Herrick et al., 1997).

D'autres opérons polycistroniques s'apparentant fortement à l'opéron *nah* de par leur séquence déduite en acides aminés et l'arrangement de leurs gènes, les opérons *pah* (Takizawa et al., 1994), *dox* (Denome et al., 1993) et *ndo* (Kurkela et al., 1988) et un autre, possédant une faible homologie et présentant un ordre de gènes différent, *phn* (Laurie et Lloyd-Jones, 1999), ont été découverts. Enfin, quelques auteurs ont remarqué la présence d'autres gènes de dégradation du NAP, non apparentés avec ceux déjà connus, c'est-à-dire n'hybridant pas avec les sondes dérivées des gènes *nah*, *pah*, *dox*, *ndo* ou *phn* ou dont l'ordre était différent de celui déjà documenté (Goyal et Zylstra, 1996, Annweiler et al., 2000, Churchill, Harper et Churchill, 1999, Stapleton et al., 1998, Fuenmayor et al., 1998).

#### 2.4.2.2 Voies de dégradation des autres HAP

Les HAP plus complexes que le NAP peuvent être dégradés selon plusieurs voies métaboliques différentes, peu caractérisées jusqu'à maintenant. Le PHE fait l'objet d'au moins deux voies de dégradation, certaines étapes enzymatiques de ces voies ressemblant beaucoup à celle du NAP (Bouchez et al., 1996b). Il n'est pas déterminé si les deux voies peuvent coexister dans un même microorganisme ou non (Aitken et al., 1998). Une troisième voie a récemment été proposée par Samantha, Chakraborti et Jain (1999).

De nombreux auteurs ont rapporté l'implication directe du système plasmidique de dégradation du NAP dans la dégradation du PHE, de l'ANT, du FLU et du PYR (Menn, Applegate et Saylor, 1993, Sanseverino et al., 1993a, Zylstra et al., 1994, Yang, Chen et Shiaris, 1994, Trenz et al., 1994). De même, la majorité des HAP serait dégradée selon plus d'une voie métabolique, étant la plupart du temps apparentées aux voies de dégradation du NAP et du PHE (Grifoll et al., 1995). Il est à noter que certaines bactéries dégradant le PHE sont incapables de dégrader le NAP (Kiyohara et Nagao, 1978, Goyal et Zylstra, 1996) et que certaines autres dégradant les HAP HPM sont aussi incapables d'utiliser des HAP plus simples, tels que le NAP et le PHE. C'est le cas d'une mycobactérie isolée par Tongpim et Pickard (1996), ce qui laisse croire que, pour celle-ci, la première enzyme impliquée dans la dégradation serait bel et bien distincte de la NAP dioxygénase et qu'elle posséderait une spécificité de substrat assez étroite. Un résultat similaire avait été obtenu par l'équipe de Selifonov (1993).

En ce qui concerne les voies de dégradation des HAP HPM, peu d'intermédiaires ont été jusqu'à maintenant identifiés, ce qui rend difficile l'élucidation des voies. En 1988, Mahaffey, Gibson et Cerniglia ont observé la minéralisation d'au moins deux cycles du BAA par une souche de *Beijerinckia* et identifièrent trois métabolites produits, ce qui les conduisit à élaborer une voie théorique de dégradation du BAA. En 1996, Schneider et al. furent les premiers auteurs à isoler des produits de fission d'au moins trois cycles aromatiques du BAP, ce qui les amena à en suggérer une voie de dégradation. La mycobactérie qu'ils avaient isolée présentait aussi des capacités à cliver le BAA et le PYR et possédait vraisemblablement deux sites d'attaque sur le BAP et le BAA, et un seul sur le PYR. La formation préalable d'un dihydrodiol de ces molécules laisse croire qu'une enzyme de type dioxygénase était impliquée. Ils ont aussi rapporté que l'oxydation initiale du BAP s'effectuait aux positions 4-5, 7-8 et 9-10, ce qui implique soit une dioxygénase à action large, soit plusieurs dioxygénases.

En 1998, Aitken et al. ont isolé 8 microorganismes minéralisant le CHY, le BAA et le BAP par cométabolisme, après croissance préalable sur le PHE. Les bactéries isolées par ce groupe étaient incapables de minéraliser le PYR, ce qui laisse croire que chez elles la minéralisation du BAA, du CHY et du BAP impliquerait des chemins métaboliques similaires, tandis que la minéralisation du PYR serait due à un chemin métabolique différent. En 1991, Grosser, Warshawsky et Vestal avaient au contraire observé qu'un isolat dégradant le PYR pouvait aussi minéraliser le BAP et avaient suggéré que le clivage enzymatique du PYR et du BAP chez leur mycobactérie puisse être catalysé par la même enzyme. Enfin, Molina, Araujo et Hodson (1999) ont observé une

souche dégradant le PYR en présence de chloramphénicol (un inhibiteur de la synthèse des protéines) après induction par le PHE, suggérant que ces deux HAP sont dégradés par le même système enzymatique. Selon ces auteurs, les plus faibles rendements de minéralisation obtenus lorsque la souche était induite par le PHE, comparativement au PYR, pourraient suggérer que plus d'un système enzymatique soit impliqué dans la dégradation du PYR chez cette souche. En 1992, Kiyohara, Takisawa et Nagao remarquèrent aussi que toutes les souches dégradant le PYR ou l'ANT qu'ils avaient isolées dégradait aussi le PHE, ce qui suggère des voies métaboliques communes. Enfin, d'autres auteurs ont proposé des voies de dégradation du FLU (Casellas et al., 1998, Grifoll et al., 1992, Monna, Omori et Kodama, 1993), de l'ANT (Cerniglia et Heitkamp, 1989), du PYR (Cerniglia, 1992, Walter et al., 1991, Ho et al., 2000) et du FLA (Cerniglia, 1992, Kelley et al., 1993, Weissenfels et al., 1991, Ho et al., 2000). Ces voies ne demeurent cependant qu'au stade hypothétique, tous les intermédiaires de dégradation n'ayant pas été isolés. La figure 1 illustre les étapes métaboliques principales impliquées dans la dégradation aérobie des HAP par les bactéries, les algues et les champignons.

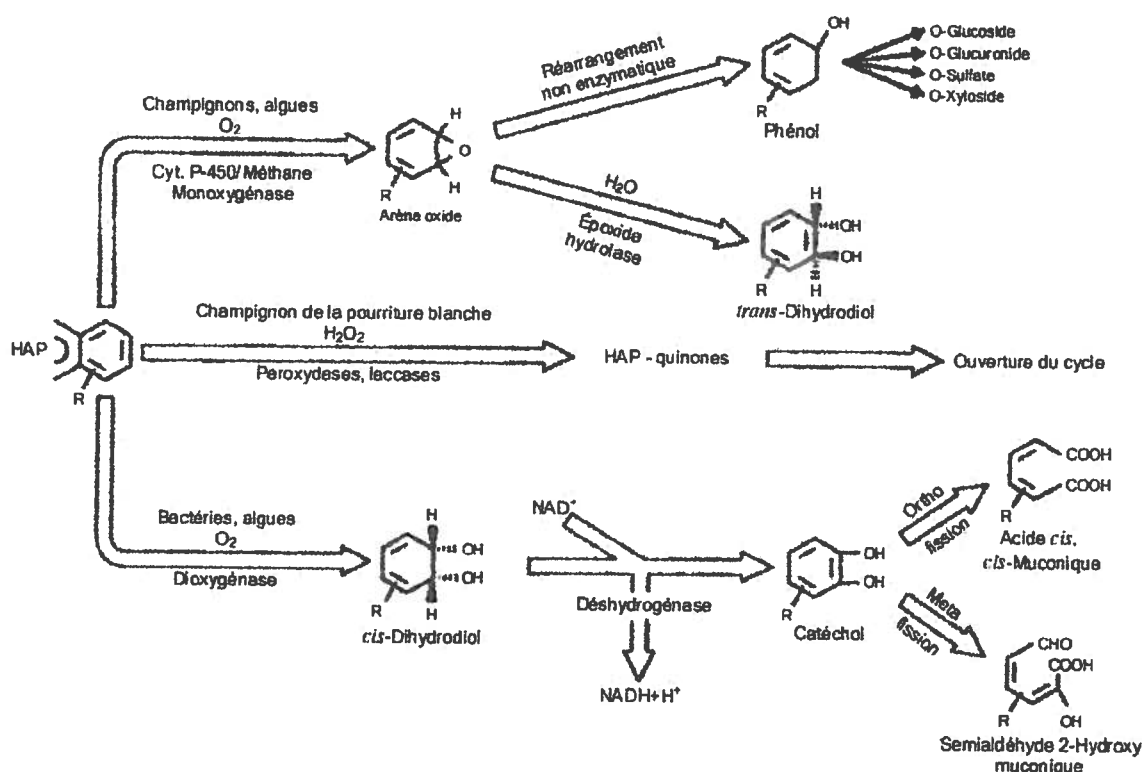


Figure 1: Voies de dégradation suggérées pour le métabolisme aérobie des HAP chez les eucaryotes et les procaryotes (adapté de Cerniglia, 1993).

#### 2.4.2.3 Voies de dégradation des bactéries anaérobies

Les voies de dégradation des HAP en conditions anaérobies demeurent encore nébuleuses. Il a cependant été démontré que la carboxylation du NAP et du PHE, conduisant à la formation d'analogues du benzoate, s'avère être une des premières étapes de leur dégradation (Zhang et Young, 1997).

#### 2.4.2.4 NAP dioxygénase et autres oxygénases bactériennes

La NAP dioxygénase est de loin l'enzyme reliée au métabolisme des HAP la plus étudiée. Celle-ci est impliquée dans la première étape de dégradation du NAP. Cette enzyme multimérique est composée d'une flavoprotéine (aussi appelée réductase), d'une ferrédoxine et de deux sous-unités comportant des centres fer-soufre. Sa structure tridimensionnelle a récemment été déterminée par Kauppi et al. (1998). Le site actif de l'enzyme a été caractérisé par Carredano et al. (2000), qui observèrent que celui-ci pouvait accueillir des composés aromatiques planaires, tels que le NAP, l'indole et le biphenyle. Barriault et al. (1998 et 1999) avaient auparavant déjà observé l'action de la NAP dioxygénase sur les BPC.

En 1994, Grifoll, Selifonov et Chapman ont rapporté avoir observé des activités de dioxygénation, de monooxygénation et de désaturation par la NAP dioxygénase. Trenz et al. (1994) et Gibson et al. (1995) ont, eux aussi, observé de tels phénomènes. Ces études indiquent qu'une monooxygénase n'est pas nécessairement présente lorsqu'il y a monooxygénation, contrairement à ce qui avait longtemps été cru. En 1996, Resnick, Lee et Gibson ont montré que des activités de sulfoxydation, de O- et de N-désalkylation pouvaient aussi être reliées à la NAP dioxygénase. Enfin, Walter et al. (1991) ont étudié l'action d'une dioxygénase suite à des traitements extrêmes et ont remarqué que cette enzyme demeurait active entre les pH 5,5 et 9,0 et après traitement à la chaleur (60°C, 10 min.).

Hedlund et al. (1999) ont observé que, malgré un très haut niveau de similarité entre deux NAP dioxygénases, le profil de dégradation des HAP des microorganismes pouvait être différent. Erickson et Mondello (1993) avaient observé le même phénomène avec la dioxygénase du biphenyle, leur étude révélant que les différences cataboliques n'étaient dues qu'à quelques acides aminés clé. Selon Wang, Lau et Button (1996) et Barriault et Sylvestre (1999), de nombreuses dioxygénases (dont la dioxygénase du biphenyle, celle du toluène et celle du NAP) se seraient différenciées durant l'évolution, mais auraient conservé de grandes similitudes génétiques entre elles. Enfin, ces derniers auteurs prouvèrent en 1999 que la portion ferrédoxine

des dioxygénases était davantage responsable de la spécificité enzymatique que la portion réductase.

Il demeure possible que certaines souches microbiennes possèdent plus d'une dioxygénase, ce qui résulterait en un spectre plus large de dégradation des HAP (Hedlund et al., 1999). Ces auteurs prouvèrent aussi que certaines bactéries marines possèdent un système de dégradation des HAP homologue à celui des bactéries du sol. Dans certains cas, il semblerait que la spécificité de la NAP dioxygénase soit plutôt large (Denome et al., 1993, Selifonov et al., 1998), cette dernière pouvant catalyser la dégradation de nombreux HAP en des produits de dégradation centraux, par la suite dégradés par d'autres enzymes. Les autres oxygénases impliquées dans la dégradation des HAP, qui n'ont pas été caractérisées, pourraient vraisemblablement aussi effectuer la réaction d'oxygénation initiale sur plus d'un HAP (Stringfellow et Aitken, 1995a).

#### 2.4.2.5 Inducteurs de dégradation des HAP

Chez certaines bactéries, la dégradation des HAP semble constitutive et peut se produire à un niveau basal, sans induction (Tagger, Truffaut et Le Petit, 1990, Chen et Aitken, 1999). Heitkamp, Franklin et Cerniglia (1988b) ont quant à eux observé que les enzymes de dégradation du PYR chez une mycobactérie étaient inductibles. Les travaux de Lainesse (2000), Churchill, Harper et Churchill (1999) et Molina, Araujo et Hodson (1999) supportent aussi cette hypothèse.

##### 2.4.2.5.1 Salicylate

Le biphényle et le *m*-xylène ont déjà été utilisés comme inducteurs pour la dégradation des HAP (Mahaffey, Gibson et Cerniglia, 1988), mais seul le salicylate a déjà été rapporté comme inducteur direct de la dégradation du NAP (Schell, 1985, Ogunseitán et Olson, 1993, Sanseverino et al., 1993b) et d'autres HAP tels que le FLU, le PHE, l'ANT, le FLA, le PYR, le CHY, le BAA et le BAP (Dagher et al., 1997, Chen et Aitken, 1999). Ce faible nombre d'inducteurs suggère une haute spécificité pour l'induction génétique (Ogunseitán et Olson, 1993). L'induction de toutes ces voies métaboliques par le même inducteur suggère quant à elle une régulation semblable entre elles (Sutherland et al., 1995).

En 1999, Chen et Aitken ont observé un effet d'induction concentration-dépendant; le salicylate, à des concentrations < 0,3 mM, stimulait la minéralisation de HAP n'étant pas utilisés comme substrats de croissance par une souche de *Pseudomonas*, mais inhibait cette dégradation à des concentrations plus élevées, laissant supposer un effet de toxicité ou d'inhibition compétitive.

Marcoux et al. (1998, 2000) n'ont, quant à eux, pas obtenu d'effets d'induction lors de l'addition de salicylate, de benzoate, de catéchol ou d'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque (premier intermédiaire de la dégradation du PHE) à leurs cultures. Ces intermédiaires pourraient avoir été dégradés très rapidement après leur ajout dans les cultures.

#### 2.4.2.5.2 HAP

Plusieurs auteurs ont rapporté qu'un HAP FPM pouvait activer la dégradation de HAP HPM, non dégradés autrement (Bauer et Capone, 1988, Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991, Stringfellow et Aitken, 1995a, Juhasz, Britz et Stanley, 1997a,b), possiblement grâce à des phénomènes de cométabolisme ou encore d'induction des enzymes par le plus petit HAP. Lorsque cela se produit, la dégradation du HAP HPM peut continuer d'elle-même une fois qu'elle a été amorcée. Marcoux et al. (2000), Juhasz, Britz et Stanley (1997a,b), de même que McNally, Mihelcic et Lueking (1999), Molina, Araujo et Hodson (1999) ont aussi observé l'effet positif de l'addition de HAP FPM sur la dégradation de HAP HPM, normalement dégradés plus lentement, laissant aussi présager un effet d'induction (Marcoux et al., 2000).

En 1999, Samantha, Chakraborti et Jain ont observé que l'ajout de HAP HPM stimulait la minéralisation du PHE, sans qu'ils ne puissent expliquer ce résultat. En 1996, Ye et al. avaient aussi observé l'effet positif d'un HAP HPM, le FLA, cette fois sur la dégradation d'autres HAP HPM. Enfin, Kanaly et Bartha (1999) ont observé que l'ajout de diésel, d'huile de chauffage, de kérosène, d'huile brute<sup>1</sup> et des portions aromatiques ou aliphatiques de celle-ci (séparément) ont eu un effet positif sur la minéralisation du BAP par une flore mixte, sans pouvoir déterminer la nature de cet effet ni le composé responsable. Selon ces auteurs, les mixtures d'hydrocarbures testées ont pu servir comme substrats, mais ont aussi possiblement favorisé la dissolution du BAP, augmentant ainsi sa biodisponibilité et permettant d'atteindre un taux très rapide de minéralisation.

Kelly et Cerniglia (1995), Stringfellow et Aitken (1995a), Ye et al. (1996), Shuttleworth et Cerniglia (1996), McNally, Mihelcic et Lueking (1999) et Surovtseva, Ivoilov et Belyaev (1999) ont quant à eux noté une réduction de la minéralisation ou une inhibition de la dégradation en présence de HAP additionnels, ce qu'ils ont attribué à une inhibition

---

<sup>1</sup> L'huile brute est une mixture complexe de différentes classes structurales de composés, incluant les alcanes, les composés aromatiques, les composés hétérocycliques polaires et les asphaltènes (Uraizee, Venosa et Suidan, 1998).

des enzymes impliquées, ou à une compétition des HAP pour les mêmes voies métaboliques ou pour le même système de transport des HAP à l'intérieur des cellules. Guha, Peters et Jaffé (1999) ont émis un modèle cinétique pour prédire les interactions entre HAP dans des mélanges contenant deux et trois HAP différents. Selon eux, en mélange, le taux de dégradation du HAP le plus facilement biodégradable est réduit, dû à une inhibition compétitive, alors que les HAP les plus récalcitrants connaissent une augmentation de leur taux de dégradation. La portée de ces effets est directement reliée au nombre de substrats présents.

Benachenhou (1998) a obtenu des résultats corroborant ce modèle cinétique théorique. Kazunga et Aitken (2000) ont aussi conclu que, chez certaines souches, des intermédiaires de dégradation du PYR inhibaient la dégradation du PHE et du BAP. Selon Cornelissen et al. (1998), l'accumulation de métabolites inhibiteurs pourrait mener à la persistance à long terme de certains HAP dans l'environnement. Ces résultats démontrent que la présence d'un contaminant supplémentaire peut influencer les capacités de dégradation d'une souche. L'effet observé peut dépendre du type et de la concentration des hydrocarbures présents dans le milieu et du temps d'exposition (Bauer et Capone, 1988).

## **2.5 Dégradation des HAP par cométabolisme**

### **2.5.1 Cométabolisme chez les bactéries**

Pour les HAP HPM, le cométabolisme demeure un mécanisme de dégradation très répandu (Bouchez et al., 1996b). Le cométabolisme est un phénomène par lequel il y a dégradation fortuite d'un substrat (HAP), alors que l'enzyme impliquée a plutôt pour but de dégrader un autre composé, plus ou moins structurellement apparenté. Le cométabolisme peut être imputé à une faible spécificité des enzymes impliquées. Le substrat principal peut être un HAP ou non (extrait de levure, protéose peptone, amidon de maïs, etc). Cependant, l'utilisation conjointe de substrats non homologues aux HAP peut inhiber la dégradation de ces derniers, comme cela fut constaté dans certaines conditions avec le succinate et le glucose (Guerin et Jones, 1988, Laha et Luthy, 1991, Keuth et Rehm, 1991). Heitkamp, Franklin et Cerniglia (1988b) ont cependant obtenu de bons rendements de minéralisation du PYR en présence de 10% dextrose et 10% lactose. De même, l'une des premières bactéries oxydant les HAP HPM étudiée ne pouvait utiliser ces derniers pour croître et son milieu devait contenir du succinate et du biphenyle. Il s'agissait d'une souche de *Beijerinckia*, étudiée par l'équipe de Gibson en 1975, cométabolisant le BAA et le BAP. Un autre cas de biodégradation du BAP et du FLA par cométabolisme était rapporté cette même année (Barnsley, 1975). Kelley et Cerniglia (1995), Caldini et al. (1995), ainsi que Kanaly



et Bartha (1999) ont aussi rapporté d'autres cas de bactéries dégradant les HAP par cométabolisme en présence de substrats n'étant pas des HAP.

Des études récentes mettent en évidence l'ampleur du cométabolisme lorsque les substrats de croissance sont les HAP eux-mêmes. De nombreuses souches cultivées sur un HAP possèdent la capacité de dégrader un autre HAP non utilisable comme substrat et présenté comme cosubstrat (Tiehm et Fritzsche, 1995, Shuttleworth et Cerniglia, 1996, Dagher et al., 1997, Geiselbrecht et al., 1998, Selifonov et al., 1998, Hedlund et al., 1999, Surovtseva, Ivoilov et Belyaev, 1999, Boonchan, Britz et Stanley, 2000). Bouchez, Blanchet et Vandecasteele (1995a) ont caractérisé huit types de situations pouvant survenir lors de la dégradation simultanée de deux HAP : cométabolisme ① avec ou ② sans inhibition de la dégradation du HAP substrat ou ③ avec stimulation de sa dégradation (synergie), absence de cométabolisme ④ avec ou ⑤ sans inhibition, ⑥ effet toxique du cosubstrat, ⑦ dégradation simultanée de deux substrats ou ⑧ antagonisme entre ces substrats. D'une façon générale, les interactions négatives l'emportent sur les interactions positives. Ces données sont essentielles à considérer lors de l'étude de la dégradation des HAP puisqu'ils sont toujours présents en mélange dans l'environnement. Ainsi, on peut déduire que la part de dégradation par cométabolisme dans l'environnement est très significative. Le mutualisme entre les souches permet à la fois la détoxification par l'utilisation des métabolites ainsi que l'utilisation complète des substrats, de même que l'attaque et la minéralisation de HAP peut-être inutilisables comme substrats de croissance par toute souche individuelle (Bouchez et al., 1996b). Par contre, le cométabolisme peut aussi conduire à des impasses métaboliques et ne permet pas toujours la dégradation complète des composés.

### 2.5.2 Cométabolisme chez les champignons et voies de dégradation des HAP

Chez les champignons, l'attaque par cométabolisme est la règle (Atlas et Cerniglia, 1995, Bouchez et al., 1996b). Comme chez les bactéries, la première étape de la dégradation des HAP par les champignons consiste en une oxydation. Les champignons non lignolytiques catalysent l'attaque initiale des HAP par une monooxygénase, produisant de très nombreux isomères *trans*-diols, ultérieurement transformés en différents composés tels les phénols, les diols et les quinones (April, Foght et Currah, 2000) ou encore se conjuguant avec d'autres molécules présentes dans le milieu (sulfates, glucose, xylose, etc) (Bouchez et al., 1996a). On note aussi l'intervention d'enzymes du cytochrome P-450, conduisant à la formation d'époxydes (Atlas et Cerniglia, 1995, Launen, Pinto et Moore, 1999). L'attaque des HAP par les champignons non lignolytiques ne conduit pas à une ouverture du cycle, mais à une accumulation de métabolites avec détoxification

(Bouchez et al., 1996b). Enfin, il ne semble pas y avoir de corrélation directe entre la quantité de biomasse formée et le niveau de métabolisme des HAP (Launen, Pinto et Moore, 1999)

Les champignons lignolytiques produisent des enzymes extracellulaires lorsqu'ils sont cultivés dans des conditions limitantes en azote, en carbone ou en soufre. Ces enzymes initient une attaque radicalaire sur la molécule de HAP, suivie ensuite de réactions d'addition d'eau, d'oxydoréduction et d'oxydation. La nature des produits de transformation subséquents diffère selon l'espèce (Bogan et Lamar, 1996), mais il s'agit souvent de quinones, qui peuvent être dégradées dans certaines conditions par les champignons eux-mêmes ou encore par des bactéries environnantes (Field et al., 1992). Hammel et al. (1992) ont observé que la minéralisation des HAP était dépendante des conditions de culture : en conditions lignolytiques, la minéralisation du PHE était de 6% contre 0,1% en conditions non lignolytiques. Enfin, le mode d'attaque extracellulaire des HAP pourrait vraisemblablement être couplé à une dégradation intracellulaire due au cytochrome P-450 (Novotný et al., 1999).

Parmi les performances les plus intéressantes notées chez les champignons, soulignons que le champignon *Phanerochaete chrysosporium* est capable de minéraliser le BAP par cométabolisme avec diverses autres sources de carbone (Sanglard, Leisola et Fliechter, 1986, Barclay, Farquhar et Legge, 1995) et que le BAA et le PER s'avèrent être métabolisés par certaines peroxydases fongiques (Hammel, Kalyanaraman et Kirk, 1986).

## 2.6 Système biphasique

Plusieurs types de bioréacteurs ont été mis au point, permettant le traitement de sols, d'effluents ou de gaz contaminés. Grandement utilisé, le système de type slurry consiste en une boue homogène, qui met en contact l'effluent ou le sol à décontaminer avec une phase aqueuse contenant des microorganismes capables de dégrader les polluants. Ce type de système est habituellement agité pour permettre une oxygénation suffisante et un bon contact entre les microorganismes et le substrat. L'utilisation du système slurry est cependant limitée aux polluants possédant une bonne solubilité dans l'eau car les polluants hydrophobes demeurent sous forme non dissoute dans un tel système. Quelques auteurs ont cependant observé la dégradation de HAP dans ce type de réacteur (Mueller et al., 1991, Pinelli et al., 1997).

Le système biphasique, aussi appelé système multiphasique ou à deux phases liquides, est inspiré du réacteur slurry, mais comporte en plus une phase liquide hydrophobe. L'ajout de cette dernière

lui confère un avantage indéniable par rapport au système slurry car elle augmente le taux de dissolution de composés peu solubles, donc peu biodisponibles, ce qui favorise leur biodégradation (Efroymsen et Alexander, 1991, Jimenez et Bartha, 1996, Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993, Vanneck et al., 1995). Plusieurs auteurs ont obtenu des rendements de dégradation supérieurs en utilisant un système biphasique plutôt qu'un système slurry (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993, Benachenhou, 1998, Gardin, Lebeault et Pauss, 1999, Marcoux et al., 1998, 2000).

#### 2.6.1 Enrichissement de microorganismes

L'enrichissement de microorganismes dégradant les HAP en système slurry est une méthode de sélection habituellement longue. Au contraire, le système biphasique s'avère une méthode efficace et rapide pour l'enrichissement de microorganismes dégradant des substances extrêmement peu solubles, quoiqu'elle demeure peu utilisée. L'avantage d'un tel enrichissement est de maintenir l'inoculum en présence de faibles concentrations de substrats, de façon à éviter un effet d'inhibition sur les microorganismes, peu habitués à la présence de ces substrats, mais de maintenir la concentration de ceux-ci suffisamment élevée pour permettre une réponse d'adaptation, ce qui n'est pas toujours le cas dans les systèmes slurry (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993). Les travaux de ces auteurs, de même que ceux de Marcoux (1998), constituent un exemple d'enrichissement réussi de microorganismes en système biphasique. L'acclimatation des microorganismes peut se traduire par une diminution de la période de latence avant le début de la dégradation d'un composé ou une augmentation de son taux de dégradation.

#### 2.6.2 Taux de transfert de masse

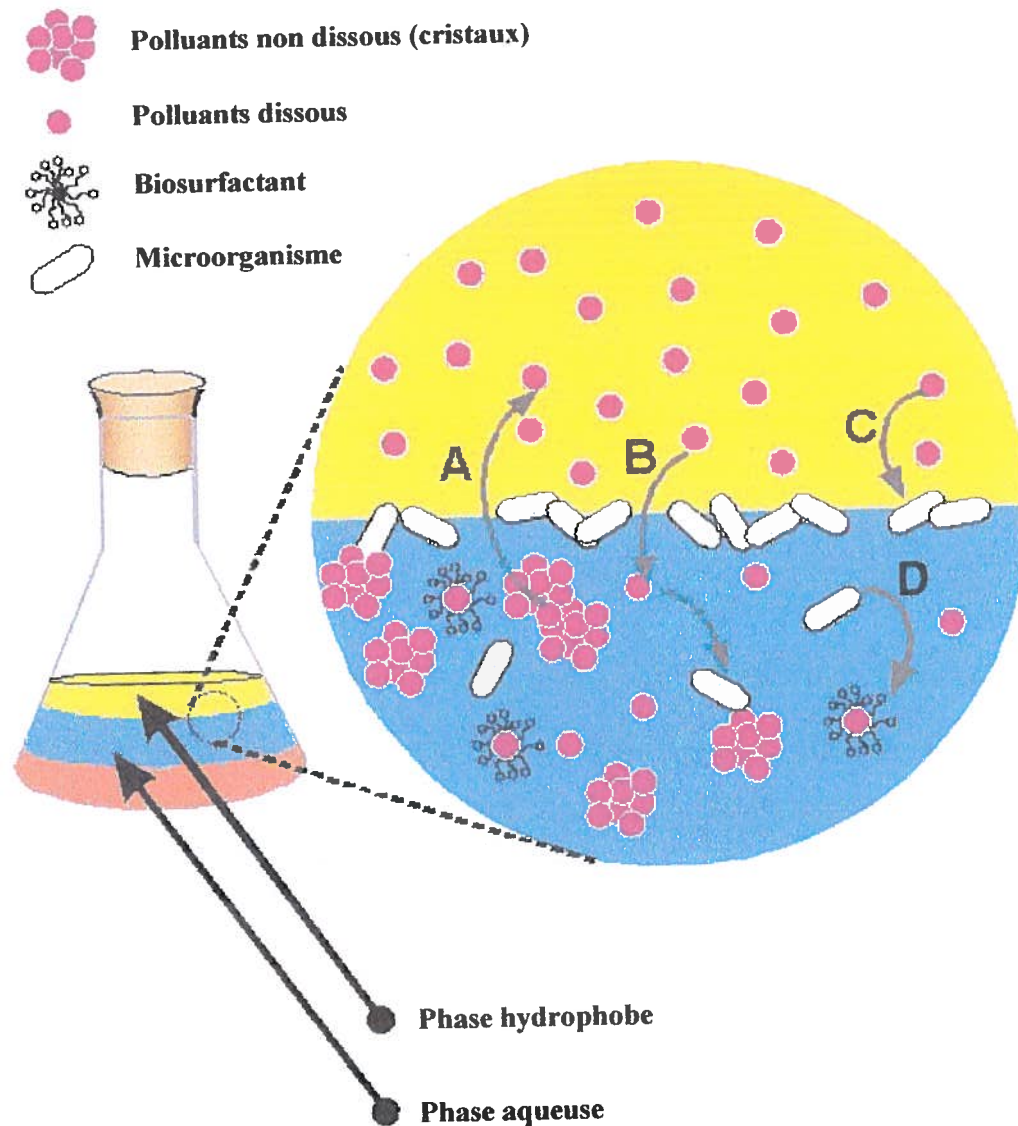
Le taux de transfert de masse correspond à la vitesse à laquelle un composé passe d'une phase à l'autre du système, par exemple de la phase solide (cristaux de HAP) à la phase aqueuse (HAP dissous). Ce taux est proportionnel à la différence de solubilité du composé entre les deux phases. La biodégradation des contaminants étant reliée à leur solubilité, elle est donc aussi reliée à leur taux de transfert de masse (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995c, Shuttleworth et Cerniglia, 1995). Lorsque la concentration cellulaire dans la phase aqueuse est basse, il est possible d'observer une phase exponentielle de croissance des cellules. Cependant, à haute densité cellulaire, la demande pour le substrat atteint les capacités maximales de transfert du système et la biodégradation atteint dès lors un taux limité par le transfert du substrat vers la phase aqueuse (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995c, Shuttleworth et Cerniglia, 1995).

Dans un système biphasique, le taux de transfert de masse est d'autant plus élevé que la surface de contact entre les différentes phases est importante (Volkering et al., 1992). La biodégradation est donc fonction de la taille de l'interface entre les deux phases liquides (Köhler et al., 1994, Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995a, Marcoux, 1998). Dans ce type de système, l'interface est maximisée par rapport au système slurry, dû à la dispersion de la phase hydrophobe en fines gouttelettes dans la phase aqueuse, ce qui facilite le taux de transfert de masse du substrat hydrophobe vers la phase aqueuse. L'interface entre les phases hydrophobe et aqueuse du système biphasique est influencé par le ratio des phases, le taux d'agitation du système et la croissance microbienne (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995a). La forme physique et la dimension des particules cristallines de HAP (lorsqu'il y en a) et la taille des gouttelettes de solvant hydrophobe ont déjà été reconnues comme étant des facteurs majeurs affectant le taux de transfert de masse (Volkering et al., 1992, Jimenez et Bartha, 1996, Tongpim et Pickard, 1996, Uraizee, Venosa et Suidan, 1998).

#### 2.6.3 Principe du système biphasique et acquisition des polluants par les microorganismes

Selon de nombreux auteurs, les HAP doivent se trouver sous forme dissoute dans l'eau pour être dégradés (Wodzinski et Coyle, 1974, Bossert et Bartha, 1986). Toutefois, d'autres auteurs ont observé que certains microorganismes pouvaient dégrader des HAP très peu solubles, à des taux impressionnants (Boldrin, Tiehm et Fritzsche, 1993, Ye et al., 1996), qu'il était difficile d'expliquer. Selon Bastiaens et al. (2000), ces microorganismes posséderaient un autre mode d'acquisition des HAP. Surovtseva, Ivoilov et Belyaev (1999) ont aussi observé que la surface de HAP en cristaux pouvait être colonisée par des microorganismes, ce qui suggère que ceux-ci puissent utiliser des HAP sous forme non dissoute dans l'eau.

Dans le système biphasique, les composés hydrophobes (HAP) se dissolvent majoritairement dans la phase hydrophobe, de par leur plus grande affinité pour cette dernière (voir figure 2, A). Une fois solubilisés dans cette phase, les composés rediffusent lentement et progressivement vers la phase aqueuse, à un niveau sous-inhibiteur, jusqu'à l'atteinte de leur solubilité maximale (figure 2, B). Les microorganismes du système consomment les HAP présents en fonction de leurs besoins métaboliques (Collins et Daugulis, 1997). Ainsi, dans un système biphasique, les HAP sont maintenus à une concentration réduite dans la phase aqueuse, mais sont présents en forte concentration dans la phase hydrophobe (Munro et Daugulis, 1996).



**Figure 2 : Schéma d'une culture de type biphasique et du mode d'acquisition du substrat par les microorganismes.**

Les microorganismes présents dans le système biphasique se retrouvent dans la phase aqueuse et à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe du système. Plusieurs auteurs ont observé la formation d'un biofilm à l'interface des deux phases liquides (voir section 2.6.6). Trois mécanismes ont été suggérés pour expliquer l'acquisition par les microorganismes d'un composé dissout dans la phase hydrophobe (Déziel, Comeau et Villemur, 1999). Ces mécanismes sont l'acquisition du composé hydrophobe sous forme dissoute dans la phase aqueuse (figure 2, B),

l'acquisition directe du composé par les microorganismes localisés à l'interface des deux phases liquides (figure 2, C) et l'acquisition du composé solubilisé à l'intérieur de micelles de surfactants (figure 2, D) (voir section 2.6.5). Une combinaison de ces trois mécanismes semble envisageable, de façon consécutive ou simultanée. Le deuxième mode d'acquisition (acquisition directe) réfute les allégations voulant que la biodégradation de composés extrêmement insolubles, comme les HAP comportant 5 et 6 cycles, soit impossible dû à leur faible taux de transfert de masse dans la phase aqueuse (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1997). L'hypothèse de l'acquisition directe est supportée par les observations de plusieurs auteurs (Efroymsen et Alexander, 1994, Ortega-Calvo et Alexander, 1994, Osswald, Baveye et Block, 1996), selon lesquelles la dégradation de substrats peut survenir plus rapidement que leur taux de transfert entre la phase hydrophobe et la phase aqueuse.

#### 2.6.4 Choix de la phase hydrophobe et de sa proportion

Plusieurs solvants peuvent être utilisés comme phase hydrophobe dans le système biphasique, dont les *n*-alcanes (Efroymsen et Alexander, 1991 et 1994, Abe et al., 1995, Gamerdinger, Achin et Traxler, 1995), les hydrocarbures aliphatiques (Collins et Daugulis, 1996, 1997), l'huile de silicone (El Aalam, Pauss et Lebeault, 1993, Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993 et 1995a, Bouchez, Blanchet et Vandecastelle 1995a, Vanneck et al., 1995, Osswald, Baveye et Block, 1996, Benachenhou, 1998, Gardin, Lebeault et Pauss, 1999, Marcoux et al., 2000), l'huile de paraffine (Jimenez et Bartha, 1996) et le 2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane (Wodzinski et Larocca, 1977, Efroymsen et Alexander, 1991 et 1994, Köhler et al, 1994, Fu et Alexander, 1995, Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1997). Le choix de la phase hydrophobe dépend principalement des microorganismes présents dans le système biphasique puisque le solvant doit être non toxique et non biodégradable par ces derniers. Il doit de plus être non volatil, non miscible à la phase aqueuse, inerte et permettre une solubilisation efficace des polluants hydrophobes étudiés (Collins et Daugulis, 1997). Enfin, il ne doit pas séquestrer ces derniers car il réduirait ainsi leur biodisponibilité pour les microorganismes (Efroymsen et Alexander, 1995).

La proportion occupée par la phase hydrophobe dans le système biphasique doit permettre d'obtenir la plus grande surface de contact possible entre les phases hydrophobe et aqueuse, afin d'observer un taux de transfert de masse maximal (Woodley, Brazier et Lilly, 1991). Cette proportion optimale varie en fonction des caractéristiques propres de chaque système, telles que la vitesse d'agitation (Köhler et al., 1994), la forme du réacteur utilisé, le taux de répartition des HAP entre les différentes phases du système et la présence de surfactants (Benachenhou, 1998).

Marcoux (1998) a aussi conclu qu'une plus grande surface de contact accélèrait la dégradation de HAP HPM mais, selon Benachenhou (1998), l'augmentation de la dégradation n'est pas nécessairement proportionnelle à l'augmentation de la phase hydrophobe. Efrogmson et Alexander (1991), de même que Jimenez et Bartha (1996) ont utilisé un système biphasique dont la phase hydrophobe représentait 0,2-1,6% du mélange, tandis que Abe et al. (1995), Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) et Köhler et al. (1994) ont utilisé respectivement une proportion de l'ordre de 10, 20 et 25%, et Collins et Daugulis (1996, 1997, 1999a, 1999b), de 30%. Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) ont démontré que, dans leur système, les performances diminuaient lorsque la phase hydrophobe occupait une trop grande proportion (> 40%). Cet effet pourrait être dû à une plus faible diffusion de l'oxygène dans le système lorsque la proportion de la phase hydrophobe est trop élevée (Benachenhou, 1998). Collins et Daugulis (1996, 1997, 1999a, 1999b) ont aussi éprouvé des problèmes de diffusion de l'oxygène dans leur système.

### 2.6.5 Agents tensioactifs

La méthode la plus utilisée pour augmenter la biodisponibilité d'un substrat constitue à augmenter son taux de transfert de masse, grâce à l'utilisation d'agents tensioactifs (Shuttleworth et Cerniglia, 1995). Ces agents sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire possédant un pôle hydrophile et un pôle hydrophobe, ce qui leur confère la capacité de former des micelles. Ces dernières favorisent la pseudosolubilisation d'un composé hydrophobe dans la phase aqueuse, en le dissolvant au niveau de la partie hydrophobe du micelle (à l'intérieur). Suite à l'agitation du système, les micelles sont en contact étroit avec les microorganismes et ces derniers peuvent se localiser à l'interface micelle/phase aqueuse et acquérir ainsi le composé hydrophobe. L'action principale des surfactants est de rendre les composés hydrophobes, les HAP, plus accessibles aux microorganismes, ce qui permet d'augmenter grandement leur taux de dégradation. La nature du surfactant et la concentration utilisée sont cruciaux pour les résultats obtenus et dépendent des autres paramètres du système (nature des cellules, du milieu et du substrat à dégrader, etc) (Liu, Jacobson et Luthy (1995), Head, 1998). Il existe une très grande variété d'agents tensioactifs, dont les surfactants synthétiques et les biosurfactants.

#### 2.6.5.1 Effets positifs des surfactants synthétiques

Les surfactants synthétiques non toxiques et n'étant pas utilisés par les microorganismes pour leur croissance ont des chances de produire des effets positifs sur la dégradation des HAP. Mueller et al. (1990) ont observé que l'addition d'un agent émulsifiant dans le milieu de culture augmentait la solubilité du FLA dans l'eau et améliorerait ainsi sa biodégradation. Efrogmson et Alexander

(1991), Tiehm (1994), Ortega-Calvo et Alexander (1994), Dagher et al. (1997), Samantha, Chakraborti et Jain (1999) et Van Hamme et Ward (1999) ont aussi observé des résultats positifs lors de l'ajout de surfactants synthétiques, tels que le Triton X-100 ou le Tween 80, ce qui dénote que ceux-ci ont effectivement augmenté l'accès des polluants aux microorganismes.

#### 2.6.5.2 Effets négatifs, mitigés ou absence d'effet des surfactants synthétiques

Jimenez et Bartha (1996), de même que Laha et Luthy (1991), ont observé que l'ajout d'un détergent à une concentration inférieure à sa concentration micellaire critique (CMC) améliorerait la dégradation des HAP, alors qu'une concentration plus élevée que la CMC inhibait la dégradation, possiblement dû à la séquestration des HAP dans les micelles (Laha et Luthy, 1991, Tiehm, 1994). Köhler et al. (1994) ont quant à eux observé un effet positif de leurs surfactants sous de faibles conditions d'agitation uniquement, aucun effet n'étant observé lorsque l'agitation était plus rapide que 110 rpm. Enfin, Willumsen, Karlson et Pritchard (1998) ont observé un effet positif du Triton X-100 en présence de cations divalents et un effet négatif lorsque ces derniers n'étaient pas présents.

Plusieurs auteurs (Zaidi et Imam (1999), Marcoux et al., 2000) n'ont pas observé d'effets lors de l'ajout d'agents tensioactifs, alors que d'autres (Guerin et Jones, 1988, Fu et Alexander, 1995, Ye et al., 1996, Boonchan, Britz et Stanley, 1998) ont observé un effet négatif lié à cette pratique. Selon ces derniers auteurs, l'effet négatif pourrait être exercé uniquement sur un HAP en particulier. Selon Willumsen et Arvin (1999), une inhibition de la dégradation reliée à la présence de surfactants pourrait être due à la biodisponibilité réduite des HAP (ou de leurs sous-produits de dégradation) séquestrés dans les micelles, à une inhibition du pouvoir adhérent des cellules, à l'effet toxique du surfactant sur les cellules (dû à la solubilisation partielle ou complète des membranes cellulaires) ou encore à une interférence avec les processus enzymatiques impliqués dans la dégradation des HAP. Il est en effet connu que les surfactants peuvent interagir avec les protéines (Chan et al., 1991). En 1999, Willumsen et Arvin ont proposé un modèle mathématique décrivant la solubilisation, la biodisponibilité et la biodégradation du FLA, capable de bien prédire la minéralisation initiale de ce composé par une souche de *Sphingomonas*, en présence de Triton X-100.

#### 2.6.5.3 Production de biosurfactants et de bioémulsifiants

La production de biosurfactants et de bioémulsifiants par les microorganismes est une alternative intéressante et prometteuse à l'utilisation de surfactants synthétiques, puisqu'ils sont en général



peu toxiques, très diversifiés et biodégradables (Desai et Banat, 1997). Cette stratégie permet par le fait même de réduire les coûts associés à l'achat de surfactants synthétiques. Les biosurfactants et les bioémulsifiants sont deux types de produits pouvant être sécrétés par les microorganismes et possédant une activité émulsifiante, mais qui sont bien distincts l'un de l'autre, de par leurs structures et leurs activités. Les bioémulsifiants sont généralement formés d'un mélange plus ou moins défini de bio-polymères, dont la composition ressemble à la membrane cellulaire (Hommel, 1990) et leur action consiste à émulsifier l'une des phases du système biphasique, i.e. la phase hydrophobe. Les biosurfactants ont, quant à eux, une structure davantage déterminée : un pôle hydrophile (composé de sucres, d'acides carboxyliques, d'acides aminés ou de peptides) et un pôle hydrophobe (composé d'acides gras, saturés ou non) (Georgiou et Lin, 1992). Leur structure amphiphile leur permet de jouer sensiblement le même rôle que les surfactants synthétiques, c'est-à-dire de favoriser la pseudosolubilisation des HAP et l'émulsification de la phase hydrophobe.

De nombreux auteurs ont postulé que les microorganismes produisant des biosurfactants devaient obligatoirement être hydrophobes, mais Bouchez-Naïtali et al. (1999) ont remarqué que des bactéries très hydrophiles pouvaient aussi produire des biosurfactants. Ils expliquent cette observation par le fait que l'extérieur d'un micelle de biosurfactant est constitué du pôle hydrophile et qu'une bactérie hydrophile pourrait y adhérer efficacement. Quant aux bactéries hydrophobes produisant des biosurfactants, Bouchez-Naïtali et al. mentionnent que, dans ces cas, des phénomènes d'émulsification des HAP sont vraisemblablement impliqués. Dans ce cas, les composés émulsifiés comporteraient des régions hydrophobes à leur surface, auxquelles les microorganismes hydrophobes adhéreraient. Le mode d'action des biosurfactants se situe au niveau de l'émulsification du composé hydrophobe et/ou de sa solubilisation ou d'un changement d'hydrophobicité des membranes cellulaires.

Quelques bactéries dégradant les HAP possèdent la capacité de sécréter des biosurfactants (Dagher et al., 1997, Tiehm, 1994, Efrogmson et Alexander, 1994, Ortega-Calvo, Birman et Alexander, 1995, Van Hamme, Odumeru et Ward, 2000). La production de biosurfactants est induite par des conditions de culture précises pour un microorganisme donné (Efrogmson et Alexander, 1994). Elle peut être observée lorsque les cellules croissent en présence d'un substrat soluble (glucose, mannitol, dextrose) (Duvnjak et Kosaric, 1985, Bouchez-Naïtali et al., 1999) ou peu soluble, comme les HAP (Déziel et al., 1996). Les biosurfactants sont habituellement sécrétés abondamment à la fin de la phase exponentielle de croissance, alors que les conditions du milieu

deviennent limitantes. Déziel et al. (1996) ont observé à ce moment une importante augmentation de l'hydrophobicité de surface des cellules. Des résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature à propos de l'effet de l'ajout de biosurfactants sur la dégradation des HAP, certains auteurs ayant observé un effet favorable (Oberbremer, Müller-Hurtig et Wagner, 1990) et d'autres un effet nuisible (Marcoux et al., 2000). Notons finalement qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre la capacité de production de biosurfactants d'une souche et sa capacité à dégrader les HAP (Dagher et al., 1997).

Quoique plus rares, les études portant sur les bioémulsifiants révèlent qu'ils peuvent être très efficaces en tant qu'agents tensioactifs. Par exemple, l'émulsifiant Alasan a été utilisé dans une expérience de Barkay et al. (1999), où il a permis de plus que doubler le taux de minéralisation du FLA par une souche de *Pseudomonas paucimobilis*. Notons que, dans un système biphasique, la production de biosurfactants et de bioémulsifiants entraîne une émulsion stable de la phase hydrophobe (Osswald, Baveye et Block, 1996).

#### 2.6.6 Hydrophobicité des microorganismes

Dans le système biphasique, il a été noté que les microorganismes adhérant à la phase hydrophobe possèdent une hydrophobicité de surface accrue par rapport aux autres microorganismes de la phase aqueuse (Osswald, Baveye et Block, 1996). L'hydrophobicité d'un microorganisme est une caractéristique pouvant varier selon le milieu et les conditions de culture, ainsi que selon l'état physiologique des cellules (Rosenberg, 1991). Ainsi, un microorganisme donné peut être localisé à plusieurs endroits différents du système biphasique dans le temps, l'attachement étant graduel et reflétant les changements d'hydrophobicité de surface des cellules dans le temps (Efroymsen et Alexander, 1991, Jimenez et Bartha, 1996). Köhler et al. (1994) ont quant à eux observé la dégradation des HAP par des souches incapables d'adhérer au solvant hydrophobe, démontrant que l'attachement des cellules à cette phase n'est pas un prérequis pour la dégradation des HAP en système biphasique.

La formation d'un biofilm à l'interface phase aqueuse/phase hydrophobe a souvent été notée, ce qui suggère une forte activité métabolique à cet endroit. En 1996, Jimenez et Bartha ont démontré que le taux de minéralisation du PYR par les microorganismes localisés à l'interface était 8,5 fois plus élevé que par ceux en suspension dans la phase aqueuse, suggérant que les microorganismes se positionnant à cet emplacement possèdent de meilleures capacités métaboliques. Ortega-Calvo et Alexander (1994) et Marcoux (1998) ont observé le même phénomène, mais de façon plus

modeste. Ascon-Cabrera et Lebeault (1995a) ont suggéré que l'activité de dégradation observée dans leur système biphasique soit principalement due à la biomasse adhérente à la phase hydrophobe. Ces auteurs ont observé que plus de 50% de la biomasse de leurs cultures était adhérente au solvant après 24 heures. Il est à retenir cependant que Efrogmson et Alexander (1991) ont observé que les microorganismes pouvaient aussi adhérer au solvant lorsque celui-ci ne contenait aucun substrat.

## **2.7 Conclusion**

Il a été démontré que, dans le cas de polluants peu solubles dans l'eau comme les HAP, particulièrement ceux possédant plus de quatre cycles aromatiques, le système biphasique offrait certains avantages par rapport aux autres systèmes biologiques utilisés jusqu'à maintenant. Cependant, un manque de connaissances quant au comportement des microorganismes, notamment en ce qui concerne leur localisation dans le système biphasique, est flagrant et ne permet donc pas de comprendre tous les phénomènes en jeu. Le manque d'information quant aux microorganismes eux-mêmes (voies d'acquisition des HAP, identité des gènes et des systèmes enzymatiques impliqués, etc) est également important. Les interactions entre microorganismes à l'intérieur d'un consortium dans un tel système demeurent encore inconnues, ce qui empêche d'élucider les mécanismes impliqués dans la dégradation. Enfin, l'optimisation de certains paramètres physico-chimiques du système biphasique pourrait améliorer les rendements de dégradation observés lors de la dégradation des HAP HPM dans ce type de système.

**3**

***Matériel et Méthodes***

### **3.1 Produits chimiques et milieux de culture**

#### **3.1.1 HAP et solutions stock utilisés**

Les HAP NAP, PHE, FLU, CHY, BAP, PER (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) et PYR (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) ont été utilisés au cours des présentes expériences. Des solutions stock de ces HAP (sauf le NAP et le FLU) ont été préparées dans du dichlorométhane (DCM, distillé dans le verre, Anachemia Canada Inc., Montréal, Qc) à 2000 mg/L (PHE, PYR et CHY) et 1000 mg/L (BAP et PER). Dans le cas des deux dernières solutions, la dissolution complète des cristaux de HAP pouvait nécessiter une exposition aux ultrasons (appareil à ultrasons, modèle ultrasonic 8845-30, Cole-Parmer Instrument Co., Chigaco, IL). Ces solutions stock ont été conservées à l'obscurité, à 4°C, et utilisées lors de la préparation de la phase hydrophobe (voir section 3.1.2). D'autres solutions stock de PHE, FLU, PYR, CHY et BAP (de 2, 2, 1, 1% (p/v) dans l'acétone (HPLC grade, EM Science, Gibbstown, NJ) et 1% (p/v) dans le DCM, respectivement) ont aussi été fabriquées. Elles ont été conservées à la température de la pièce, à l'obscurité, et utilisées lors de la vaporisation des HAP sur géloses (voir section 3.6.2.1).

#### **3.1.2 Préparation des fioles expérimentales**

Les informations décrites dans cette section sont générales et s'appliquent à toutes les expériences dans lesquelles le système biphasique a été utilisé.

Le sol utilisé dans les expériences est désigné sous le nom MS et a été utilisé auparavant par Marcoux (Marcoux, 1998). Celui-ci a déterminé que ce sol avait une composition de 50% de sable, 37% de silt et 13% d'argile et qu'il possédait 3% de matière organique. Le sol MS provient d'un site non contaminé. Il a été tamisé préalablement aux expériences (particules de diamètre < 1,2 mm) et conservé à 4°C. Le sol a été utilisé tel quel dans les expériences ou sous forme d'extrait de sol. L'extrait de sol a été préparé en ajoutant 10% de sol MS dans du milieu Bushnell-Haas (BH, Difco Laboratories, Detroit, MI), en stérilisant ce mélange à l'autoclave pendant 20 min., puis en le centrifugeant pour récupérer le surnageant (750 g, 10 min., centrifugeuse Avanti J-25, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA). L'extrait de sol ainsi préparé était considéré équivalent à 10% de sol MS. Des proportions égales d'extrait de sol 10% et de milieu BH ont habituellement été utilisées pour composer la phase aqueuse des systèmes biphasiques avec extrait de sol, pour une concentration finale d'extrait de sol équivalent à 5% de sol (dans la phase aqueuse).

Les expériences dans lesquelles le consortium a été étudié ont été pratiquées en système biphasique dans des erlenmeyers de 1000 mL contenant 10 g de sol MS stérile (ou 35 mL d'extrait de sol stérile 10%), 60 ou 35 mL de milieu BH (lorsque du sol et de l'extrait de sol était utilisé, respectivement), 20 mL d'huile de silicone 20 centistokes (cSt, diméthylpolysiloxane, Sigma Chemical Co., contenant des HAP) et 10 mL d'inoculum provenant d'un enrichissement dont le sol était stérile et âgé entre 9 et 22 jours (voir section 3.3.1). Ces proportions ont été conservées tout au long des expériences et des enrichissements effectués. Les cultures ont été incubées à 25°C, à l'obscurité, et l'agitation des fioles a été de 150 rpm.

L'huile de silicone constituait la phase hydrophobe du système biphasique. Elle a été préparée en fonction des besoins expérimentaux, le nombre et la quantité de HAP présents pouvant varier d'une expérience à l'autre. La quantité de HAP requise au début des expériences a été, sauf indication contraire, de 100 mg pour le PHE, le PYR et le BAP, de 70 mg pour le CHY et de 50 mg pour le PER, par litre d'huile de silicone. Les HAP ont été prélevés des solutions stock et ajoutés à l'huile de silicone, qui a ensuite été agitée sur une plaque agitatrice plusieurs heures pour faire évaporer le DCM. La concentration des HAP dans l'huile a, en dernier lieu, été déterminée par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (voir section 3.2).

Dans les expériences où le NAP a été utilisé, il se trouvait sous forme de cristaux retenus dans du coton fromage fixé au bouchon, d'où il saturait l'atmosphère des fioles par ses vapeurs. Certaines expériences ont requis des ajouts fréquents de PHE, de PYR ou de CHY. Dans ces cas, les HAP ont été ajoutés directement en fins cristaux à l'intérieur des fioles et se sont dissous progressivement dans l'huile de silicone. Cette méthode a permis d'éviter l'ajout de DCM, lié à l'utilisation des solutions stock de HAP, celui-ci pouvant présenter une toxicité envers les microorganismes.

### 3.1.3 Milieux de culture utilisés pour l'isolement et l'étude de souches microbiennes provenant du consortium (section 3.6)

Les milieux de culture liquides suivants ont été utilisés: Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories), TSB 10% (milieu TSB dilué avec 90% d'eau déionisée stérile), R2A liquide (composé de 0,5 g d'extrait de levure, 0,5 g de peptones (50% de digestion pancréatique de caséine et 50% de digestion peptidique de tissus animaux), 0,5 g d'hydrolysate acide de caséine, 0,5 g de dextrose, 0,5 g d'amidon soluble, 0,3 g de phosphate de dipotassium, 0,024 g de sulfate de magnésium anhydre et 0,3 g de pyruvate de sodium par litre d'eau distillée) et BH avec extrait

de sol. Dans les expériences étudiant des isolats microbiens purs dans un système biphasique (voir section 3.6), l'huile de silicone a été stérilisée par filtration avant d'être ajoutée aux milieux expérimentaux, préalablement stérilisés.

Les milieux solides utilisés ont été le Tryptic Soy Agar (TSA, Difco Laboratories), le TSA 10% (milieu TSA dilué avec 90% d'eau déionisée, additionné de 1,5% d'agar (technical grade, Difco Laboratories)), le R2A (Becton Dickinson, Cockeysville, MD), le BHA (milieu BH additionné de 1,5% d'agar noble (Difco Laboratories)) et le BHY (milieu BH additionné de 0,05% d'extrait de levure (Difco Laboratories) et de 1,5% d'agar (technical grade, Difco Laboratories)).

Ces milieux solides et liquides ont été utilisés à différents moments au cours des expériences. Il a parfois été nécessaire d'utiliser des milieux de culture riches (TSB, TSA, BHY), convenant à la croissance d'un grand nombre de microorganismes, et parfois des milieux plus pauvres (TSB 10%, TSA 10%, R2A, BH et extrait de sol), favorisant la croissance de microorganismes oligotrophes.

Le tampon phosphate salin (PBS, pH 6,8) a été fabriqué à partir de solutions de  $K_2HPO_4$  0,01M (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ) et de  $KH_2PO_4$  0,01M (J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, NJ), auquel a été ajouté 0,15 M NaCl (J. T. Baker Chemical Co.).

### **3.2 Extraction des HAP de l'huile de silicone et dosage par HPLC**

Dans le système biphasique, l'analyse des HAP a été effectuée par HPLC après leur extraction de l'huile de silicone. Celle-ci a été effectuée selon la méthode suivante. Un prélèvement de 250  $\mu$ L d'huile a été mélangé avec 500  $\mu$ L de N,N-diméthylformamide (DMF, HPLC grade, Sigma Chemical Co.) pendant 1,5 min. sur vortex. Les phases ont été séparées par centrifugation à 750 g (centrifugeuse Sorvall GLC-2B, Du Pont Instruments, Newtown, CT) pendant 5 min. La phase du DMF, dans laquelle les HAP se sont solubilisés, a été recueillie (300  $\mu$ L) et placée dans un vial pour HPLC (vials de plastique de 700  $\mu$ L, Waters Corporation, Milford, MA), où l'addition de 300  $\mu$ L d'un mélange d'acétonitrile (HPLC grade, EM Science) et d'acide acétique (0,2% (v/v)) (Anachemia Canada Inc.) est venue compléter la préparation.

Les analyses par HPLC ont été effectuées à l'aide d'un appareil (Waters Corporation) composé d'un contrôleur (#600), d'une pompe (#600), d'un détecteur (#486) et d'un injecteur automatique (#717). La colonne utilisée a été de type phase inverse (Nova Pack  $C_{18}$ , 3,9 x 150 mm, Waters

Corporation). L'absorbance des composés a été mesurée à 254 nm. Un logiciel, le Millennium 32 (Waters Corporation), a permis le contrôle des composantes ci-haut énumérées et l'analyse des données. La phase mobile utilisée (débit : 2mL/min.) était initialement constituée de 65% d'acétonitrile et 35% d'eau, tous deux additionnés de 0,1% (v/v) d'acide acétique. Un gradient linéaire allant jusqu'à 85% d'acétonitrile et 15% d'eau était effectué en 8 min., puis la colonne était ré-équilibrée à 65% d'acétonitrile pendant 2 min. Des courbes standard de HAP, de 0 à 125 mg/L (PYR, CHY, BAP, PER) et de 0 à 250 mg/L (PHE), ont été réalisées. Le temps d'éluion de chaque HAP selon le gradient utilisé a été de 3,00 min. (PHE), 4,20 min. (PYR), 5,25 min. (CHY), 6,75 min. (PER) et 7,40 min. (BAP) (voir chromatogramme à l'annexe 2).

### **3.3 Enrichissement et conservation du consortium microbien**

#### **3.3.1 Méthode d'enrichissement**

Les microorganismes utilisés dans les présentes expériences faisaient initialement partie d'un consortium microbien non défini, obtenu par Marcoux (1998) suite à l'enrichissement d'un sol contaminé aux HAP. Ce consortium avait été repiqué à tous les mois durant deux ans, dont un an et demi en système biphasique, avant le début des présents travaux. Le consortium employé était continuellement maintenu en présence de quatre HAP (PYR, CHY, BAP et PER), afin de conserver ses capacités de dégradation et de continuer son enrichissement. Celui-ci s'est poursuivi durant toute la période de cette étude.

Les enrichissements ont été préparés selon les mêmes proportions de phases que les cultures expérimentales (voir section 3.1.2). Les enrichissements ont été pratiqués avec du sol stérile (stérilisation à l'autoclave pendant 60 min., à deux reprises) et non stérile, en parallèle. La fréquence des repiquages se situait autour de 21 jours.

#### **3.3.2 Méthode de conservation par congélation du consortium microbien et des souches isolées**

Les souches isolées du consortium ont suivi une procédure de congélation qui consistait à placer une forte densité de microorganismes, prélevés d'un milieu gélosé où la croissance était abondante, dans 5 mL d'une solution stérile de R2A liquide contenant 27% de glycérol (préalablement stérilisé par filtration, EM Science). Ce mélange a ensuite été vortexé et séparé en aliquots de 500 µL, par la suite entreposés à -80°C. Dans le cas du consortium microbien, 2 mL ont été prélevés d'un enrichissement et placés dans 2 mL d'une solution stérile de R2A liquide contenant 50% de glycérol, puis cette dernière a été vortexée, aliquotée et congelée comme précédemment.



### **3.4 Étude et optimisation de la phase hydrophobe du système biphasique**

#### **3.4.1 Solubilité des HAP dans l'huile de silicone**

La solubilité de chacun des HAP séparément dans l'huile de silicone a été mesurée, de même que leur solubilité respective dans des mélanges de PHE, PYR, CHY et BAP, avec ou sans PER (tous les HAP en excès), et lorsque le PER était l'unique HAP en excès dans le mélange de cinq HAP.

Les expériences de solubilité ont été effectuées à 22°C dans 10 mL d'huile de silicone, saturée par 65, 25, 2, 5 et 5 mg de PHE, de PYR, de CHY, de BAP et de PER, respectivement, sauf pour l'essai dans lequel uniquement le PER était en excès, où 1, 1, 0,7, 1 et 5 mg de chaque HAP ont été ajoutés. Les mélanges ont été agités sur une plaque agitatrice durant quelques jours, de façon à ce que l'huile atteigne sa saturation en HAP. Les préparations d'huiles ont ensuite été filtrées à deux reprises sur un papier filtre Watman 41 afin d'enlever tous les cristaux de HAP résiduels, puis la concentration de chaque HAP a été déterminée par HPLC. Certaines préparations ont dû être diluées avant d'être dosées au HPLC, afin que leur concentration soit à l'intérieur de la courbe standard des HAP. Les essais de solubilité ont été réalisés en triplicata.

#### **3.4.2 Effet du volume d'huile de silicone sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM**

Pour cette expérience, des cultures contenant des proportions de 10, 30 et 40% d'huile de silicone ont été utilisées. Les quantités de HAP sont demeurées constantes entre les différents groupes de fioles, afin de ne pas ajouter un effet dû à la dose des HAP, et ont été de 0,7 mg de PYR, 0,5 mg de CHY, 1 mg de BAP et 0,35 mg de PER par fiole, celles-ci contenant de 60 à 90 mL de milieu. La concentration de chaque HAP dans l'huile diminuait donc à mesure que la proportion d'huile dans les fioles augmentait. Les cultures expérimentales contenaient de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol dans la phase aqueuse). L'inoculum utilisé dans cette expérience provenait d'un enrichissement âgé de 22 jours. Les cultures abiotiques ont été constituées du même inoculum, autoclavé pendant 60 min., et ont contenu 4% (v/v) d'azote de sodium (concentration finale). La dégradation des HAP a été mesurée sur une période de 28 jours. L'expérience a été réalisée en triplicata.

### **3.5 Effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM**

Plusieurs expériences ont été réalisées, où l'effet des HAP FPM NAP et PHE sur la dégradation des HAP HPM a été étudié. Entre chacune de ces expériences, quelques variantes étaient apportées, de façon à ce que les trois expériences effectuées amènent des éclaircissements différents sur la question.

### 3.5.1 Effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER

Dans cette expérience, les cultures expérimentales contenaient 10% de sol stérile. Deux groupes de cultures ont été préparés, l'un contenant du BAP et l'autre du PER. Chacun de ces groupes était constitué de cultures ayant reçu une dose initiale de PHE de 500 mg/L, des doses de 500 mg/L deux fois par semaine ou une seule dose saturant l'huile en PHE au jour 9 de l'expérience. L'inoculum utilisé pour ensemercer les cultures était âgé de 13 jours. Le témoin abiotique possédait un inoculum non tué et contenait de l'azote de sodium (3% (v/v), concentration finale). L'expérience a été effectuée en duplicata. La dégradation a été suivie durant 86 jours pour le BAP et 30 jours pour le PER.

#### 3.5.1.1 Mesure de l'adsorption du PER au sol

L'extraction des deux fioles abiotiques de l'expérience 3.5.1, dans lesquelles il y a eu une perte de PER d'environ 75% en 30 jours, a été effectuée. Les fioles extraites, âgées de 45 jours, ont d'abord été centrifugées (48 000 g, 15 min., centrifugeuse Avanti J-25). Les solides ont été gardés et extraits à l'acétate d'éthyle (Anachemia Canada Inc.) (trois extractions de 5 mL). L'acétate d'éthyle recueilli a été débarrassé de toute trace d'eau par un passage dans un entonnoir bouché par du coton tapé contenant 1 cm de sulfate de sodium anhydre (BDH Inc., Toronto, On). Le volume d'acétate d'éthyle a été ajusté à 50 mL dans une fiole jaugée. 1 mL de cette solution a été prélevé et concentré 10 fois par évaporation sous jet d'azote, avant d'être injecté au chromatographe en phase gazeuse (GC). Le GC (modèle HP 5890, Hewlett Packard, USA) possédait une colonne capillaire de type phényl-méthyl 5% (longueur de 25 m, diamètre interne de 0,2 mm et épaisseur de film de 0,33 µm, modèle HP-5, Hewlett Packard). Le GC était couplé à un détecteur à ionisation de flamme (FID), où l'azote était le gaz vecteur prédominant. L'hélium était utilisé comme gaz porteur de l'échantillon, à une pression constante de 20 livres par pouce carré (psi). L'injection de 2 µL d'échantillon a eu lieu en mode *sans fuite* et a duré 30 secondes, puis l'appareil est passé en mode *fuite* pour les 21,5 min. suivantes du programme. Le four était initialement à une température de 70°C, puis est passé à 310°C (20°C/min.), avant d'effectuer un plateau de 10 min. à cette température. L'injecteur était à une température de 250°C et le détecteur, à 340°C.

#### 3.5.1.2 Comparaison des pertes abiotiques entre des témoins contenant du sol et de l'extrait de sol

Parmi les cinq types de cultures de cette expérience, quatre étaient abiotiques et n'ont pas été inoculées. Elles ont contenu soit du sol (dans une proportion de 5% du volume liquide total de la fiole) ou de l'extrait de sol (en proportions équivalant à 1, 5 et 10% de sol, par rapport au volume

liquide total de la fiole), ainsi qu'un mélange de HAP HPM. L'autre type de cultures a été inoculé à partir d'un enrichissement âgé de 16 jours et comportait de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol, par rapport au volume liquide total de la fiole), de même que la phase hydrophobe contenant les HAP HPM. Toutes les cultures de cette expérience ont été réalisées en simplicata. L'expérience a eu cours durant 32 jours.

### 3.5.2 Effet du NAP sur la dégradation du PER

Dans cette expérience, 5% d'extrait de sol a été utilisé dans les cultures. Quatre groupes de cultures ont été préparés en duplicata, dont des cultures contenant du PER, avec ou sans NAP, et d'autres contenant le mélange de quatre HAP HPM et du NAP. L'inoculum utilisé avait 17 jours. Les témoins abiotiques n'ont pas été inoculés avec le consortium et sont demeurés stériles tout au long de l'expérience. Des analyses ont été effectuées périodiquement pendant 32 jours.

### 3.5.3 Effet du NAP et du PHE sur la dégradation du PYR, du CHY et du BAP

Dans cette expérience, onze groupes de fioles possédant 5% d'extrait de sol ont été préparés : des cultures contenant du PYR, du CHY et du BAP, chacun séparément ou avec du NAP ou du PHE, de même que des cultures contenant un mélange de HAP HPM, sans HAP FPM, et des contrôles abiotiques. Des ajouts quotidiens de 10 mg de PHE, durant les douze premiers jours de l'expérience, ont permis d'assurer la présence continue de ce composé dans les cultures PHE et PYR, PHE et CHY et PHE et BAP (concentration de PHE dans l'huile oscillant entre 500 et 1500 mg/L). Des ajouts subséquents n'ont pas été nécessaires. Les microorganismes utilisés dans l'expérience provenaient du consortium et ont été obtenus d'une culture âgée de 15 jours. Un contrôle abiotique, renfermant un inoculum autoclavé pendant 60 min. et ayant reçu un ajout d'azote de sodium (4% (v/v), concentration finale), a aussi été réalisé. Les fioles ont été préparées en triplicata et, dans le cas des cultures contenant du PYR sans autre HAP HPM, ainsi que pour les cultures contenant le mélange de HAP HPM et celles abiotiques, en quadruplicata. La dégradation a été suivie durant plus de 60 jours.

## 3.6 Isolement et étude de microorganismes provenant du consortium microbien

### 3.6.1 Isolement de microorganismes

Un premier essai d'isolement de microorganismes a été effectué avec le consortium après 13 repiquages contenant du sol stérile. Des dilutions sériées de  $10^{-1}$  à  $10^{-9}$  d'une culture âgée de 21 jours ont été effectuées dans du BH stérile et 0,1 mL de ces dilutions a été inoculé sur des géloses R2A. Celles-ci ont été incubées à 25°C durant sept jours ou jusqu'à la presque confluence des

colonies. Les différents types morphologiques de colonies observés ont été repiqués à plusieurs reprises sur le même milieu, jusqu'à ce qu'ils soient purs. Ils ont été maintenus par repiquages, puis soumis à la vaporisation des HAP FLU, PHE et PYR (voir section 3.6.2.1) et au test de transformation de l'indole en indigo (voir section 3.6.2.2). Les capacités de dégradation des HAP des souches ont été testées en cultures liquides onze semaines après leur isolement. Lors de la préparation des inocula pour ces essais, quelques colonies de chaque type morphologique ont été prélevées d'un milieu gélosé, mises dans du milieu R2A liquide stérile et incubées à 20°C durant 48 heures. Les cellules ont ensuite été lavées et resuspendues dans du milieu BH stérile, puis l'inoculum a été ajouté à la fois dans les fioles expérimentales (système biphasique, contenant du milieu BH avec extrait de sol stérile, équivalent à 5% de sol) ainsi que sur milieu gélosé R2A, pour confirmation du phénotype.

Le premier essai d'isolement de souches n'ayant pas été très concluant, un second essai a eu lieu huit repiquages plus tard. Le consortium utilisé, qui était maintenu avec du sol stérile, était âgé de 12 jours. Des dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  de la culture ont été effectuées en duplicata et ensemencées chacune en quintuplicata sur les milieux gélosés TSA 10%, R2A et BHY, dans le but d'obtenir la plus grande variété possible de types morphologiques différents. Parallèlement, les dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  ont aussi servi à ensemencer en duplicata des milieux gélosés BHA. Ce type de milieu ne contenant aucune source de carbone, les géloses ont été incubées dans un contenant fermé, à l'intérieur duquel des vapeurs de NAP saturaient l'atmosphère, dans le but d'isoler des microorganismes pouvant utiliser le NAP comme seule source de carbone. Les géloses TSA 10%, R2A et BHY présentant des colonies bien isolées ont été vaporisées avec les HAP FLU, PHE, PYR, CHY et BAP (voir section 3.6.2.1). Les colonies ayant formé un halo suite à la vaporisation, ayant démontré de la croissance en utilisant les vapeurs de NAP comme seule source de carbone ou possédant un intérêt particulier pour une autre raison ont, après 9 à 16 semaines de purification et de maintenance, été testées en cultures liquides de la même façon que lors du premier essai d'isolement des souches. Pour les colonies isolées grâce à leur capacité de croissance sur le NAP, les fioles des essais de dégradation des HAP possédaient un bouchon contenant des cristaux de NAP.

### 3.6.2 Caractérisation préliminaire des isolats

#### 3.6.2.1 Test de vaporisation des géloses avec un film de HAP

Le test de vaporisation d'un film de substrat sur un milieu gélosé a initialement été décrit par Sylvestre (1980) pour le *p*-chlorobiphényle, mais a été adapté aux HAP par Kiyohara, Nagao et

Yana (1982). Cette technique rapide permet la détection de microorganismes dégradant le HAP vaporisé car il y a alors formation d'une zone claire autour de la colonie dans le film opaque de HAP. Selon Kiyohara, Nagao et Yana, la formation de zones claires est fortement reliée aux capacités d'une bactérie à dégrader le HAP vaporisé.

Lors du test de vaporisation de HAP, les différents types morphologiques bactériens ont été ensemencés sur le milieu gélosé duquel ils ont été isolés (BHY, TSA 10% ou R2A) et incubés à l'obscurité jusqu'à ce que la croissance soit apparente. Un vaporisateur de réactifs pour chromatographie en couche mince (General Glassblowing, Richmond, CA) a été utilisé pour vaporiser les HAP. Cette procédure a été effectuée sous une hotte chimique. Les HAP provenaient de solutions stock dans l'acétone ou le DCM. Les géloses vaporisées ont été placées dans des contenants hermétiques pour éviter la volatilisation du film de HAP vaporisé (dans les cas du FLU et du PHE) et ré-incubées pour permettre la formation de zones autour des colonies. La présence de zones a été déterminée par l'examen des pétris au microscope binoculaire ou à l'œil nu. Il est à noter que la dégradation des HAP FLU et PYR peut occasionner la formation de pigments jaune et brun, respectivement, à l'intérieur des colonies.

#### 3.6.2.2 Transformation de l'indole en indigo : détection de l'enzyme NAP dioxygénase

En 1983, Ensley et al. (b) ont rapporté une méthode indirecte de détection de la NAP dioxygénase, la première enzyme de la voie de dégradation du NAP. En effet, cette enzyme catalyse la transformation de l'indole en indigo, ce qui occasionne l'apparition d'une coloration bleu foncé à l'intérieur des colonies impliquées ou la formation d'un pigment soluble bleu, dans les cultures liquides. L'exposition des cellules à l'indole permet donc de révéler si ces dernières possèdent la NAP dioxygénase.

Pour réaliser ce test, l'indole (Aldrich Chemical Co.) a été ajouté en cristaux dans le couvercle de pétris incubés à l'envers. Étant très volatil, l'indole saturait toute l'atmosphère de ces derniers. Les pétris pouvaient aussi contenir des cristaux de NAP ou avoir été vaporisés avec du PHE, du FLU ou du PYR, pour induire la NAP dioxygénase. Un contrôle positif a été réalisé sur la souche *Sphingomonas* 107-6 (laboratoire du Dr Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier). Chez cette souche, la coloration bleue a été apparente en moins de quelques heures.

### 3.6.3 Caractérisation de dix types microbiens provenant du deuxième isolement

Parmi les types microbiens obtenus lors du deuxième isolement, dix ont présenté des capacités de dégradation des HAP. La morphologie des colonies et des cellules de ces dix isolats, ainsi que leur réponse à la coloration de Gram (Difco Laboratories) et aux tests d'oxydase et de catalase ont été évaluées sur des cellules en phase exponentielle de croissance. Le test d'oxydase a été effectué de la façon suivante. Une colonie a été étalée sur un papier filtre et un réactif composé d'une solution aqueuse de 1% de dihydrochlorure de N,N,N',N'-tétraméthyl-*p*-phénylènediamine (Becton Dickinson) a été déposé sur ce même papier. Une coloration violet apparaissant en moins de 30 secondes signifiait une réponse positive au test, donc la présence de l'enzyme indophénol oxydase. Pour le test de catalase, une colonie a été placée sur une lame de microscope et une goutte de peroxyde 3% (Fisher Scientific Co.) y a ensuite été déposée. La formation instantanée de bulles, causée par un dégagement de gaz, indiquait la présence de l'enzyme catalase.

### 3.6.4 Étude et caractérisation approfondie de quatre isolats prometteurs

#### 3.6.4.1 Autres caractéristiques de croissance

Parmi les dix isolats dégradant les HAP, quatre ont été retenus pour des études plus poussées en fonction de leur potentiel particulier. Les isolats B1, B21, B44 et B51 ont été mis en croissance dans quatre systèmes biphasiques dont la phase aqueuse différait, afin de découvrir si certains de ces milieux étaient plus propices à leur croissance, à la dégradation des HAP ou à la production de biosurfactants (voir section 3.6.4.2). Les phases aqueuses testées ont été les milieux BHY, BH et extrait de sol (équivalent à 5% de sol), TSB et TSB 10%. La croissance des quatre isolats sur milieu solide R2A a aussi été mesurée à plusieurs températures, soit 4, 20, 28, 37 et 42°C, afin de déterminer leur température de croissance optimale respective. La croissance de ces quatre isolats sur milieu BHA en présence de vapeurs de NAP comme unique source de carbone a également été étudiée.

#### 3.6.4.2 Mesure de la tension de surface

La tension de surface des milieux a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre (modèle 21, Fisher Scientific Co., Toronto, On). Pour ce faire, un échantillon d'au minimum 10 mL de milieu de culture, exempt de cellules et d'huile, était requis. Les milieux de culture ont été centrifugés (10 000 g, 10 min., centrifugeuse Avanti J-25) et la phase aqueuse a été recueillie à l'aide d'une pipette pasteur, puis déposée dans un bécher. La mesure de la tension de surface a ensuite été directement effectuée, à l'aide d'un anneau de platine-iridium (Fisher Scientific Co.), selon la méthode de duNuoy (Churchill et Churchill, 1997). Des valeurs de tension superficielle < 30

milliNewton/m (mN/m) sont considérées comme une bonne indication de la production de biosurfactants dans un milieu (Ochsner, Hembach et Fiechter, 1995).

#### 3.6.4.3 Étude de la localisation des isolats B1, B21, B44 et B51 dans le système biphasique

Deux expériences ont été effectuées. Avant de débiter celles-ci, les isolats ont été préalablement cultivés dans un système biphasique dont la phase aqueuse était constituée de milieu R2A liquide. Ce milieu permettait la croissance, autrement lente, des isolats et l'obtention d'un inoculum important. L'incubation s'est poursuivie jusqu'à ce que les cellules soient en phase exponentielle de croissance. Avant d'entreprendre l'expérience, la capacité de dégradation des HAP par les isolats inoculés dans le milieu R2A liquide a été confirmée. De même, la vaporisation de PYR sur milieu gélosé contenant des colonies isolées a parfois été effectuée pour confirmer le phénotype des isolats avant d'entreprendre une expérience.

La dégradation du BAP par les isolats B1 et B51 dans un système biphasique contenant de l'extrait de sol, en présence de NAP, de PHE (ajouts multiples en cours d'expérience, de façon à assurer sa présence continue dans les cultures), lorsqu'il était le seul HAP présent ou faisant partie d'un mélange de HAP HPM, a été étudiée durant 39 jours. De même, la dégradation du CHY par les isolats B21 et B44, lorsque celui-ci faisait partie d'un mélange de HAP HPM, en présence de NAP ou non, a été étudiée durant près de 30 jours. La croissance des isolats a été évaluée dans la phase aqueuse et à l'interface des deux phases liquides selon un protocole de dosage de protéines cellulaires (voir section 3.6.4.3.1). Les témoins abiotiques ont été inoculés avec une suspension cellulaire préalablement autoclavée durant 60 min. et ont reçu un ajout d'azoture de sodium (4% (v/v), concentration finale). Les deux expériences ont été effectuées en triplicata.

##### 3.6.4.3.1 Dosage des protéines cellulaires

Le dosage des protéines cellulaires totales a été effectué afin d'évaluer la quantité relative de biomasse présente à divers moments dans la phase aqueuse et à l'interface des deux phases liquides du système biphasique. Pour ce faire, un volume de 5 mL de culture, devant respecter les proportions des phases hydrophobe (20%) et aqueuse (80%) du système biphasique, a été prélevé et centrifugé à 2200 g pendant 10 min. (centrifugeuse Avanti J-25). Les cellules de la phase aqueuse (culot) étaient ainsi séparées de celles de l'interface, qui demeuraient adsorbées à l'huile. Les cellules de la phase aqueuse ont été lavées deux fois au PBS afin de les nettoyer de leur milieu, qui risquait d'interférer avec le dosage protéique. Elles ont ensuite été resuspendues dans

une solution de NaOH 0,1 N (J. T. Baker Chemical Co.). Les cellules adsorbées à l'interface ont elles aussi reçu l'ajout de NaOH, pour obtenir une concentration finale de 0,1 N. Les préparations ont par la suite été traitées à 70°C pendant 45 min. Le dosage des protéines basé sur la méthode de Bradford a ensuite été effectué, en utilisant 750 µL d'échantillon et 150 µL de réactif de Bradford non dilué (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), dans des cuvettes spectrophotométriques de 3 mL (Sarstedt, St-Léonard, Qc). Le mélange a été agité et, après une incubation de 5 min. à la température de la pièce, la densité optique à 595 nm ( $D.O_{595}$ ) a été mesurée. Le témoin était constitué de 675 µL d'eau, 75 µL de NaOH 1 N et de 150 µL de réactif de Bradford non dilué. Une courbe d'étalonnage a été dressée en utilisant différentes concentrations de bovine serum albumine, variant de 0 à 12 mg/mL (Sigma Chemical Co.).

#### 3.6.4.4 Effet du PYR et du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51

La capacité de dégradation du BAP des isolats B1 et B51 a été étudiée en culture biphasique contenant de l'extrait de sol. Différentes cultures ont été effectuées avec chacun des isolats, selon les mélanges de HAP suivants : BAP seul (100 mg/L), BAP et PYR (dose initiale de PYR de 500 mg/L), BAP et CHY (dose initiale de CHY de 70 mg/L), ainsi que BAP, PYR et CHY (selon les doses précédemment évoquées), pour un total de huit types de cultures différentes. Le PYR et le CHY ont été rajoutés en forte quantité dans les fioles à mesure que leur dégradation s'accomplissait, de façon à assurer leur présence continue. Les deux témoins abiotiques ont été constitués des isolats B1 et B51, tués à l'autoclave (60 min.), et ont contenu de l'azote de sodium (4% (v/v), concentration finale). Des précultures des isolats B1 et B51 ont été incubées jusqu'à ce qu'elles atteignent une  $D.O_{595}$  de 0,4, puis ont été utilisées afin d'inoculer les fioles expérimentales. Cette expérience a été réalisée en duplicata. La dégradation des différents HAP a été suivie durant 47 jours.



**4**  
***Résultats***

#### **4.1 Étude et optimisation de la phase hydrophobe**

##### **4.1.1 Solubilité des HAP dans l'huile de silicone**

Selon Benachenhou (1998) et Kanaly et Bartha (1999), la solubilité des HAP peut varier selon qu'ils se trouvent seuls ou en mélange. Les présents essais avaient pour but de déterminer la solubilité des HAP PHE, PYR, CHY, BAP et PER, seuls et en mélange de quatre (sans le PER) ou de cinq HAP dans l'huile de silicone. Dans le mélange de cinq HAP, ceux-ci pouvaient être tous en excès ou le PER pouvait être l'unique HAP en excès. Les solubilités mesurées sont présentées au tableau 1.

**Tableau 1 : Solubilités dans l'huile de silicone des cinq HAP utilisés dans le cadre de cette étude, selon les mélanges dont ils font partie.**

	Solubilité (mg/L)				
	PHE	PYR	CHY	BAP	PER
<b>HAP seuls</b>	5247 ± 166	2358 ± 60	47 ± 3	237 ± 2	35 ± 1
<b>Mélange de quatre HAP</b>	5473 ± 167	2055 ± 228	73 ± 3	431 ± 23	-
<b>Mélange de cinq HAP, tous en excès</b>	6032 ± 505	2760 ± 155	67 ± 3	480 ± 82	36 ± 3
<b>Mélange de cinq HAP, seul le PER en excès<sup>1</sup></b>	-	-	-	-	49 ± 1

<sup>1</sup> La concentration des autres HAP était de 100 mg/L (PHE), 96 mg/L (PYR), 72 mg/L (CHY) et 105 mg/L (BAP).

Le PHE est sans contredit le HAP le plus soluble parmi ceux testés. Sa solubilité varie peu en fonction des HAP avec lesquels il se retrouve. Le PHE a en effet conservé une solubilité dépassant les 5200 ppm, seul et dans les deux mélanges où il était en excès. Dans ceux-ci, sa solubilité maximale a augmenté respectivement de 4 et de 15%. On peut considérer que la solubilité du PHE est légèrement supérieure lorsqu'il fait partie d'un mélange de quatre HAP.

Le PYR a démontré un comportement de solubilité similaire à celui du PHE, c'est-à-dire une solubilité équivalente lorsqu'il était seul et dans un mélange de quatre HAP, alors que sa solubilité dans un mélange de cinq HAP s'est avérée de 17% supérieure.

Le CHY a quant à lui démontré une solubilité définitivement plus élevée, de l'ordre de 43 à 55%, lorsqu'il faisait partie d'un mélange de quatre ou de cinq HAP par rapport à lorsqu'il était seul dans l'huile de silicone. Cela dénote que sa solubilité est très influencée par les autres HAP avec lesquels il est en contact.

Le même phénomène s'est présenté en ce qui concerne la solubilité du BAP, mais avec encore plus d'intensité, sa solubilité doublant lorsqu'il faisait partie d'un mélange de HAP (passant de 237 à 431-480 mg/L, une augmentation de 80 à 100%).

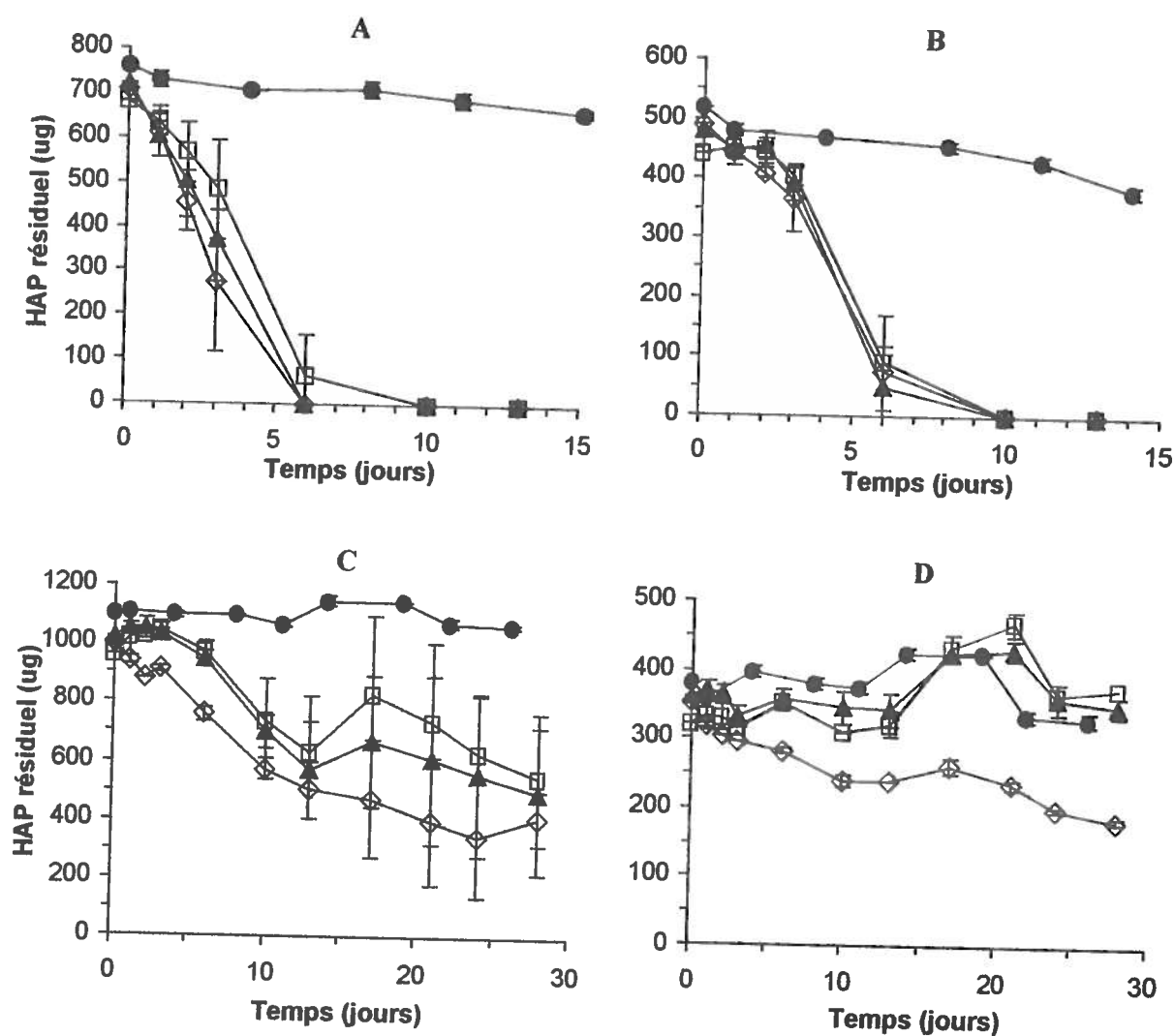
Enfin, la solubilité du PER n'a pas connu de variation lorsque ce dernier était seul ou dans un mélange de cinq HAP (tous en excès). Cependant, il a démontré une plus forte solubilité dans l'huile lors de l'essai où il était le seul HAP en excès (40% d'augmentation). Le PER est le HAP dont la solubilité dans l'huile de silicone est la plus faible parmi ceux testés.

Au regard de ces résultats, il semble clair que la solubilité d'un HAP peut être affectée de façon importante par les autres HAP avec lesquels il se retrouve en mélange et que cet effet varie d'un HAP à l'autre ainsi que selon les HAP composant le mélange.

#### 4.1.2 Effet du volume d'huile de silicone sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM

La proportion d'huile de silicone du système biphasique utilisé par Marcoux (1998) avait arbitrairement été fixée à 20%. Or, dans un système biphasique, il est connu que l'interface entre la phase aqueuse et la phase hydrophobe est un facteur crucial affectant le taux de transfert des HAP vers la phase aqueuse (voir section 2.6.2). Dans le but d'optimiser le système biphasique, une expérience visant à déterminer quelle proportion d'huile de silicone permettait les meilleurs rendements de dégradation a été menée. Les proportions d'huile 10, 30 et 40% ont été étudiées. La figure 3 illustre les cinétiques de dégradation obtenues.

En ce qui concerne le PYR, on observe un taux de dégradation légèrement supérieur avec les proportions de 10 et 30% d'huile de silicone, par rapport à 40% (figure 3 A). Pour le CHY, on



**Figure 3 : Effet de différentes proportions d'huile de silicone sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM par le consortium. Cinétique de dégradation des HAP A) PYR, B) CHY, C) BAP et D) PER dans un système biphasique lorsque les fioles contenaient de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol) ainsi que des proportions d'huile de 10 (◇), 30 (▲) et 40% (□). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).**

observe que les cinétiques de dégradation obtenues sont identiques puisque toutes les courbes se chevauchent (figure 3 B). Il semble donc que la proportion d'huile de silicone présente dans les cultures expérimentales n'ait eu que peu d'effet sur le taux de dégradation de ces deux HAP.

Dans le cas du BAP, on observe une plus forte activité de dégradation durant les premiers jours de l'expérience dans les cultures contenant 10% d'huile de silicone, comparativement aux autres cultures où un retard est observé (figure 3 C). Par la suite, les cultures ont présenté des taux de dégradation similaires.

Seules les cultures contenant 10% d'huile de silicone ont connu une certaine diminution de PER. Les cultures possédant 30 et 40% d'huile n'ont montré aucune disparition de ce HAP.

De façon générale, la proportion d'huile de silicone a eu peu d'effet sur la dégradation des HAP, sinon un léger effet pour les HAP possédant cinq cycles aromatiques (BAP et PER), où une diminution de dégradation était observée à mesure que la proportion d'huile augmentait.

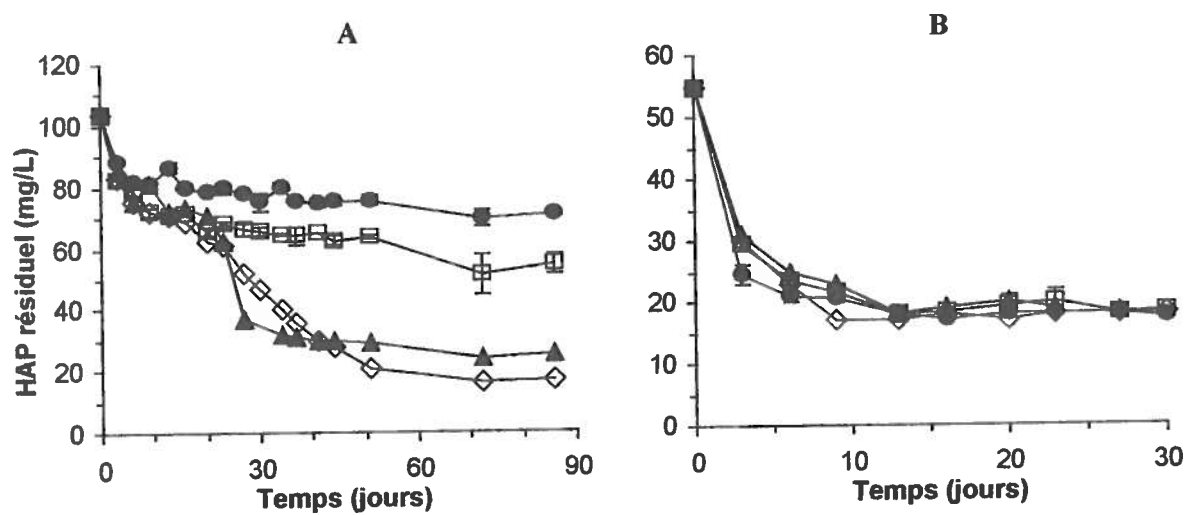
#### **4.2 Effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM**

Dans la littérature, de nombreux auteurs ont souligné l'effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM (voir section 2.4.2.5.2). Marcoux (1998) avait lui aussi obtenu des résultats positifs avec son consortium à cet égard. À la lueur de ces informations, nous avons jugé approprié de poursuivre l'étude de l'effet des HAP FPM sur le consortium.

##### **4.2.1 Effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER**

L'effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER a été étudié. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.

Les cultures ayant connu la plus grande dégradation de BAP ont été celles dans lesquelles le PHE était présent en forte quantité, c'est-à-dire celles où celui-ci a été ajouté fréquemment et celles où il saturait l'huile de silicone (figure 4 A). Ces deux types de cultures ont cependant démontré un délai de 20 jours avant que leurs cinétiques de dégradation ne se démarquent de celles des autres. Les cultures dont l'huile était saturée en PHE ont subi une importante dégradation du BAP, de l'ordre de 35%, entre les temps 20 et 27 jours, puis la concentration de BAP dans l'huile de silicone est demeurée à peu près stable. Les cultures ayant reçu fréquemment des doses de PHE



**Figure 4 : Effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du BAP et du PER.** Cinétique de dégradation A) du BAP et B) du PER, dans des cultures biphasiques possédant du sol stérile et ayant reçu une dose initiale de PHE (500 mg/L) (□), des doses fréquentes de PHE (500 mg/L, deux fois par semaine) (◇) ou dont l'huile était saturée en PHE (saturation au jour 9 de l'expérience) (▲). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).

ont quant à elles démontré une dégradation constante de BAP, jusqu'à 50 jours environ. Les pertes dues à l'activité biologique enregistrées dans les fioles saturées en PHE et dans celles ayant reçu de multiples doses de PHE sont de l'ordre de 65 à 75%. Les cultures n'ayant reçu qu'une dose initiale de PHE ont quant à elles connu une dégradation de BAP de 20%.

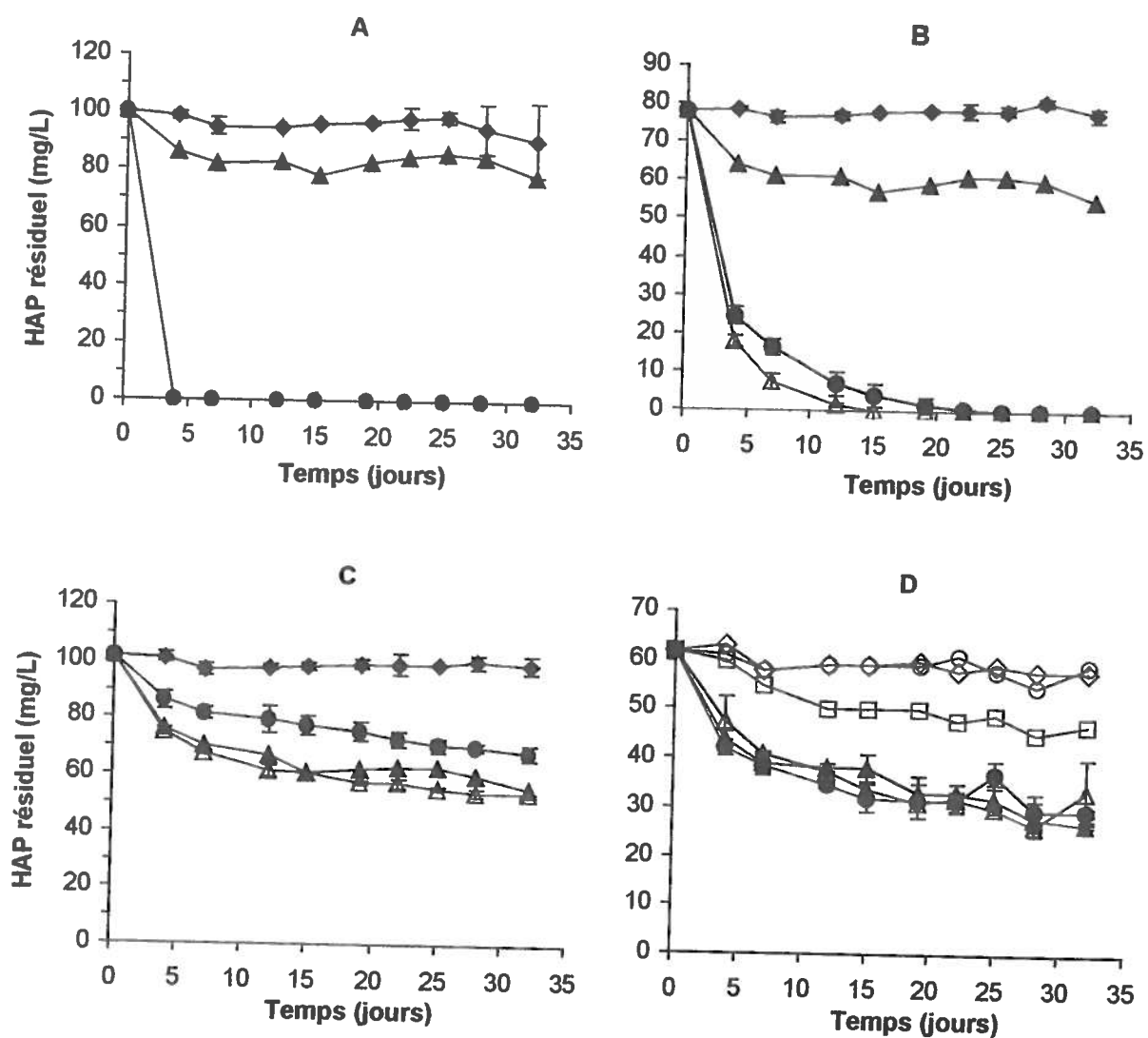
Dans le cas du PER, aucune différence entre les cultures et les témoins abiotiques n'a pu être observée (figure 4 B). Ces résultats suggèrent qu'aucune dégradation du PER n'a eu lieu. La baisse du PER dans les pertes abiotiques a été très importante puisqu'une diminution de 45 à 55% a été observée durant les premiers jours de l'expérience. Aucune des cultures n'a connu de disparition de PER subséquente.

Des pertes d'environ 73% de PER ont été observées dans les témoins abiotiques après 30 jours d'incubation. Afin de déterminer la quantité de PER adsorbée aux particules de sol, des essais d'extraction et d'analyse par GC/FID ont été effectués. Les résultats obtenus ont montré que 22% de la quantité initiale de PER dans les fioles était adsorbée aux particules de sol après 45 jours, ce qui représente 30% des pertes observées. Les autres 70% de pertes de PER n'ont donc pu être récupérés suite à une extraction du sol à l'acétate d'éthyle.

#### 4.2.1.1 Comparaison des pertes abiotiques entre des témoins contenant du sol et de l'extrait de sol

L'expérience précédente ayant démontré des pertes abiotiques de PER très importantes, nous avons tenté de modifier les conditions de culture afin de minimiser l'adsorption des HAP. Pour ce faire, l'adsorption des HAP a été étudiée dans des cultures biphasiques non inoculées contenant des particules de sol (5% (p/v)) ou de l'extrait de sol (équivalant à 1, 5 et 10% (p/v) de sol). La concentration en sol/extrait de sol variant entre ces témoins, la concentration de matière organique variait aussi d'une fiole à l'autre. Un autre groupe de cultures, ayant reçu le consortium cette fois, a parallèlement été étudié, pour fins de comparaison. La figure 5 illustre les résultats obtenus pour chacun des quatre HAP.

Des pertes abiotiques plus importantes ont été observées dans les fioles contenant du sol par rapport à celles contenant de l'extrait de sol et ce, pour tous les HAP. Dans la figure 5 A, B et C, les résultats obtenus pour les trois fioles contenant de l'extrait de sol en différentes proportions sont similaires et ont été résumés en une seule courbe. La différence entre les pertes abiotiques des deux types de témoins (avec sol et extrait de sol) se chiffre à 13% pour le PYR, 29% pour le CHY et 43% pour le BAP.



**Figure 5 : Comparaison des pertes abiotiques de HAP HPM entre des témoins contenant du sol ou de l'extrait de sol et comparaison avec la cinétique de dégradation de cultures inoculées. Cinétiques d'adsorption ou de dégradation A) du PYR, B) du CHY, C) du BAP et D) du PER, dans des cultures biphasiques non inoculées contenant du sol (5%,  $\blacktriangle$ ) ou de l'extrait de sol à concentration équivalent à 1% ( $\blacklozenge$ ), 5% ( $\circ$ ) ou 10% ( $\square$ ) de sol (pour la figure D) ou toutes proportions confondues ( $\blacklozenge$ , pour A, B et C). Les cinétiques d'adsorption ou de dégradation de cultures biphasiques inoculées contenant du sol (5%,  $\Delta$ ) ou de l'extrait de sol (5%,  $\bullet$ ) sont aussi présentées.**



Dans le cas du PER, cependant, on peut observer que le témoin abiotique contenant 10% d'extrait de sol a connu des pertes plus importantes que les deux autres témoins contenant 1 et 5% d'extrait de sol (figure 6 D), ce résultat appuyant l'hypothèse initiale de l'expérience. Les fioles contenant 1 et 5% d'extrait de sol n'ont, à toute fin pratique, pas connu de pertes de PER, tandis que le témoin contenant 10% d'extrait de sol a subi des pertes de 24% après 32 jours et le témoin contenant du sol, de 56%.

Par ailleurs, les résultats de dégradation dans les cultures possédant le consortium démontrent que la dégradation des HAP a bel et bien eu lieu dans les cultures contenant de l'extrait de sol (5%). Dans la figure 5 A, les courbes de dégradation des cultures contenant du sol et de l'extrait de sol se chevauchent tandis que, pour les autres HAP, ces courbes sont distinctes.

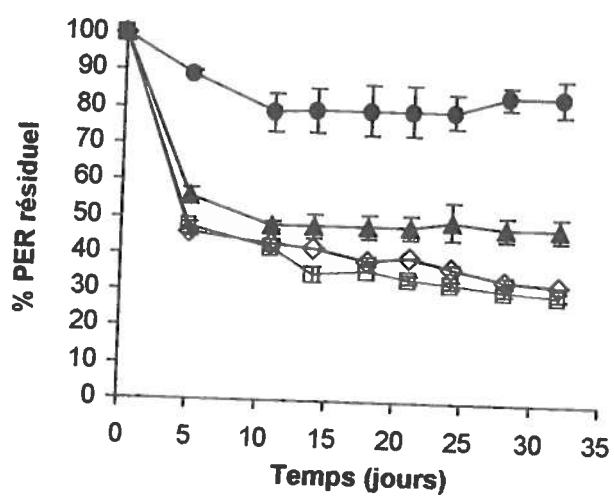
Les résultats obtenus suggèrent l'utilisation d'extrait de sol plutôt que de sol au cours des prochaines expériences, de façon à minimiser les pertes abiotiques par adsorption des HAP sur les particules de sol. Cette modification a effectivement été effectuée dans les expériences ultérieures.

#### 4.2.2 Effet du NAP sur la dégradation du PER

Afin de poursuivre l'étude de l'effet des HAP FPM sur la dégradation du PER par le consortium, l'effet du NAP a été étudié. Les témoins abiotiques n'ont pas reçu d'inoculum afin de minimiser leurs pertes. Les résultats de dégradation du PER sont présentés à la figure 6.

On peut observer que toutes les fioles inoculées ont connu un sort identique, caractérisé par une forte baisse de PER (45% à 55%) durant les cinq premiers jours de l'expérience. Ces fioles ont par la suite subi des pertes beaucoup plus faibles de PER. Les cultures contenant le mélange de HAP HPM et le NAP sont celles qui ont démontré la plus forte disparition de PER, avec 70%, suivi de près par celles contenant le PER et le NAP, avec 67%. Les cultures contenant le PER comme unique HAP ont connu une baisse nettement plus faible que les autres, en réalisant 52% de disparition en 32 jours.

Cette expérience montre des pertes initiales de PER très importantes après cinq jours. Cette baisse rapide de la quantité de PER dans la phase hydrophobe laisse croire qu'un phénomène abiotique (adsorption à la matière organique présente dans l'extrait de sol) pourrait être responsable de cette baisse et non une activité de dégradation.



**Figure 6 : Effet du NAP sur la dégradation du PER par le consortium.** Cinétique de dégradation du PER, dans des cultures contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol) et où le PER était seul (▲), en présence de NAP (◇) ou dans un mélange de HAP HPM en présence de NAP (□). Les témoins abiotiques n'ont pas reçu d'inoculum et sont représentés par le symbole (●). Chaque culture contenait initialement de 45 à 65 mg/L de PER.

#### 4.2.3 Effet du NAP et du PHE sur la dégradation du PYR, du CHY et du BAP

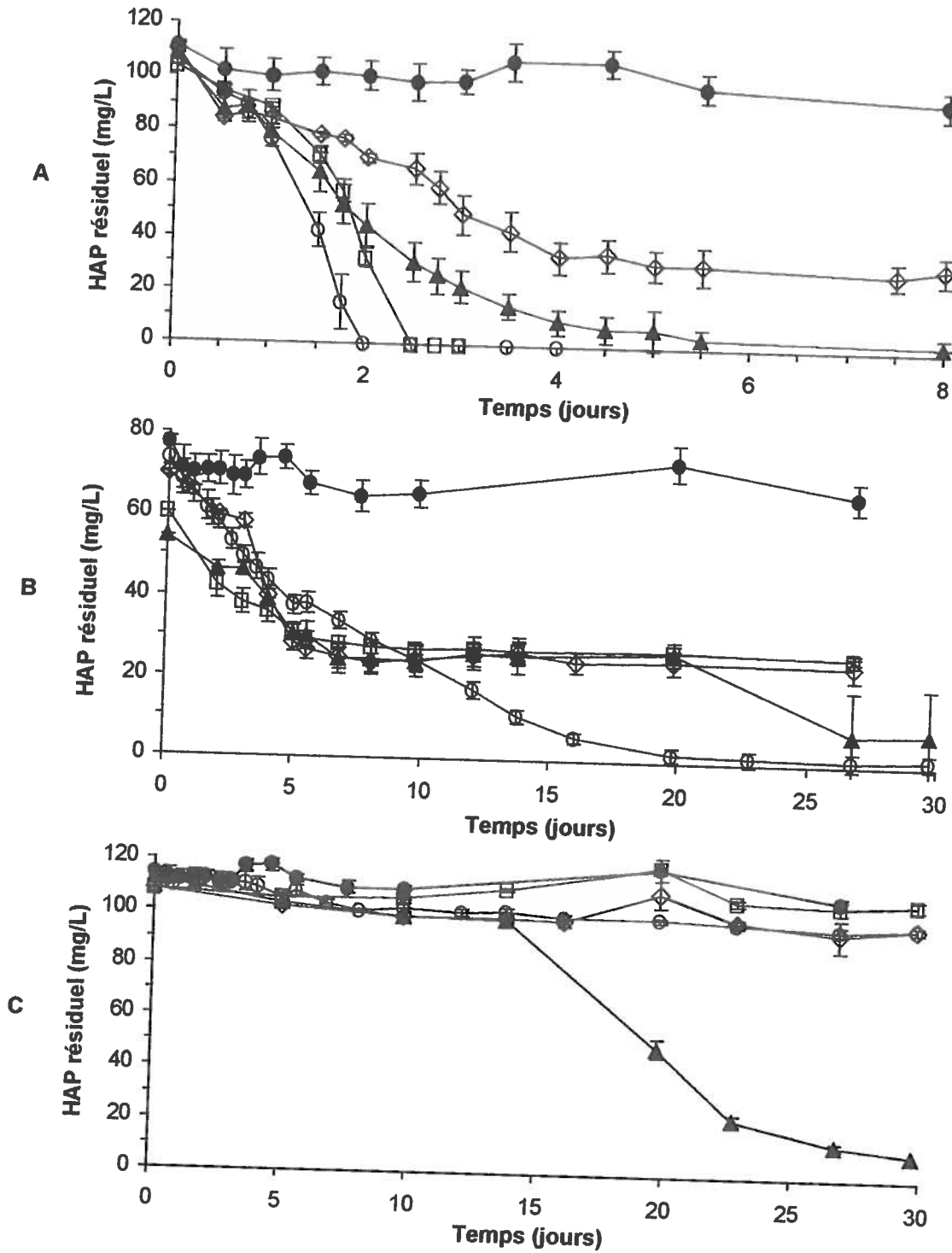
Cette dernière expérience étudiant l'effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM avait pour objectifs de déterminer l'effet du NAP et du PHE sur la dégradation des HAP HPM PYR, CHY et BAP, seuls et en mélange (figure 7).

La dégradation du PYR la plus rapide a été obtenue dans les cultures contenant le mélange de quatre HAP HPM, suivi de celles contenant le PYR seul, où la dégradation de tout le PYR a été réalisée en 2 et 2,25 jours, respectivement (figure 7 A). La dégradation du PYR dans les cultures contenant aussi du NAP n'a été complète qu'au bout d'environ 5 jours, soit en deux fois plus de temps. Dans le cas des cultures contenant du PYR et du PHE, 72% de dégradation du PYR est survenue avant qu'elle ne connaisse un plateau, après environ 4 jours, et elle n'a pas été complète, même au terme des prélèvements (au jour 62, donnée non présentée).

La meilleure dégradation du CHY a été obtenue dans les cultures contenant le mélange de quatre HAP HPM, où la dégradation a été complète en 20 jours (figure 7 B). Une dégradation partielle de 60 à 66% du CHY a été obtenue en 7 jours dans les cultures contenant du CHY et du PHE, de même que dans celles où le CHY était seul. Ces cultures ont ensuite connu un arrêt de la dégradation. Les cultures contenant du NAP et du CHY ont aussi connu une dégradation partielle, puis un temps de latence de 13 jours, avant de voir la dégradation du CHY recommencer et être presque complète en 27 jours.

Au cours de cette expérience, le BAP a été dégradé de façon significative uniquement dans les cultures contenant aussi du NAP, après une période de latence de 14 jours (figure 7 C). Suite à celle-ci, une dégradation très rapide du BAP s'est amorcée, pour atteindre 91% de dégradation après 30 jours. Les cultures contenant du BAP et du PHE ou le mélange de HAP HPM ont connu une dégradation de l'ordre de 10% tout au plus, comparativement aux témoins abiotiques. Les cultures contenant le BAP seul semblent n'avoir connu aucune dégradation au fil des 30 jours.

Les effets des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM observés lors de cette expérience sont donc variables selon le HAP HPM testé. L'addition d'un HAP FPM, que ce soit le NAP ou le PHE, a ralenti la dégradation du PYR et nuit à la dégradation du CHY, si l'on compare avec sa cinétique de dégradation en mélange. Cependant, le NAP a amélioré la dégradation du CHY si l'on compare avec sa cinétique de dégradation lorsqu'il est seul. Quant au BAP, l'effet du NAP s'est avéré très positif sur sa dégradation, alors que le PHE n'a pas exercé d'effet marqué.



**Figure 7 : Effet du NAP et du PHE sur la dégradation des HAP HPM PYR, CHY et BAP. Cinétique de dégradation A) du PYR, B) du CHY et C) du BAP, dans des cultures où ces HAP étaient mis en présence constante de NAP (▲), de PHE (10 mg/jour, durant les douze premiers jours de l'expérience) (◇), où il n'y avait aucun HAP FPM (□) et dans un mélange de quatre HAP HPM, sans HAP FPM (○). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).**

Les résultats de l'expérience précédente permettent la comparaison des cinétiques de dégradation des HAP, seuls et en mélange, afin de déterminer dans quelle situation les HAP étaient dégradés plus rapidement. La dégradation du PYR a été légèrement plus rapide (0,5 jour) lorsqu'il faisait partie d'un mélange de HAP HPM par rapport à lorsqu'il était le seul HAP présent (figure 7 A). Il est à noter que les cultures dans lesquelles le PYR était seul contenaient toujours 40% de leur quantité initiale de PYR lorsque l'autre groupe a cessé de démontrer la présence de ce HAP dans l'huile de silicone, après deux jours.

Le CHY a suivi la même tendance que le PYR, mais de façon beaucoup plus marquée, alors que sa disparition des cultures contenant un mélange de HAP HPM est survenue après environ 20 jours. Les cultures où le CHY était seul n'ont, quant à elles, pas connu une dégradation complète (figure 7 B). Ces cultures n'avaient dégradé que 50 % de leur dose initiale de CHY lorsque celui-ci a été épuisé des cultures contenant le mélange de HAP HPM.

La partie de l'expérience visant à comparer la dégradation du BAP seul et faisant partie d'un mélange de HAP HPM n'a pas donné les résultats escomptés puisque aucune de ces cultures n'a connu de dégradation, même après plus de 60 jours (figure 7 C).

Les résultats obtenus pour le PYR et le CHY démontrent que la dégradation de ceux-ci par le consortium microbien est favorisée lorsqu'ils font partie d'un mélange de HAP HPM.

### **4.3 Isolement et étude de microorganismes provenant du consortium microbien**

#### **4.3.1 Isolement de microorganismes et caractérisation préliminaire des isolats d'intérêt**

Afin de remédier aux performances de dégradation variables du consortium rencontrées, vraisemblablement causées par la grande diversité des microorganismes qui le composent et par la variation de cette flore dans le temps, il a été décidé d'isoler les souches dominantes du consortium, plus particulièrement celles effectuant la dégradation des HAP observée.

Le premier essai d'isolement de microorganismes, à partir du consortium âgé de 21 jours, a conduit à l'obtention de 39 types morphologiques différents en cultures pures. Les isolats n'ont pas donné de résultat positif au test de l'indole, aucun n'ayant produit le pigment bleu caractéristique de la transformation de l'indole en indigo, ni au test de vaporisation des HAP sur milieu gélosé. Lors de ce test, aucune zone claire n'est apparue dans le film formé par les HAP PHE, FLU et PYR vaporisés et il n'y a pas eu production de pigment jaune ou brun par les

colonies lors de la vaporisation par le FLU et le PYR. Les essais de dégradation des HAP en culture liquide ont montré qu'aucun isolat ne dégradait les HAP testés dans le milieu BH avec extrait de sol. Ces résultats nous ont mené à effectuer une deuxième procédure d'isolement.

Le deuxième isolement de microorganismes a été réalisé à partir du consortium âgé de 12 jours, selon deux approches différentes. Dans la première, des microorganismes possédant la capacité de croître en utilisant des vapeurs de NAP comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolés. Douze isolats ont été obtenus par cette méthode et dénommés isolats A1 à A12. Testés en culture liquide, ils ont tous démontré des capacités de dégradation d'un ou plusieurs HAP. Le tableau 2 résume le spectre de dégradation de ces isolats.

**Tableau 2 : Capacités de dégradation des isolats A1 à A12 envers le mélange de cinq HAP étudié (quantité initiale de 102, 113, 63, 115 et 40 mg/L de PHE, PYR, CHY, BAP et PER).**

Isolat	Dégradation des HAP (%) <sup>1</sup>				
	PHE	PYR	CHY	BAP	PER
A1	63	0	0	0	0
A2	33	48	0	0	0
A3	63	0	0	0	0
A4	47	50	0	0	0
A5	100	19	0	0	0
A6	100	64	59	20	0
A7	100	35	35	24	0
A8	100	33	25	0	0
A9	92	0	0	0	0
A10	100	18	95	31	0
A11	34	50	0	0	0
A12	82	0	0	0	0

<sup>1</sup> Indique le pourcentage des HAP dégradés par les isolats en 25 jours.

Tous les isolats capables d'utiliser le NAP comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance sont capables de dégrader le PHE, à divers degrés (tableau 2). Cinq des douze isolats ont même dégradé tout le PHE présent, et cela, en moins de 8 jours (données non présentées). Huit isolats ont démontré des capacités de dégradation du PYR, mais aucun n'a pu dégrader la totalité du PYR présent dans les conditions utilisées. Le CHY a été dégradé par quatre isolats, dont un le dégradant presque totalement (isolat A10), en environ 8 jours (donnée non présentée). Le BAP a été dégradé par trois isolats, l'isolat A10 a effectué les meilleures performances avec 31% de dégradation. Le PER est le seul HAP parmi ceux testés qui n'a connu aucune dégradation par les isolats. Enfin, il est à noter que les capacités de dégradation du CHY et du BAP semblent

être corrélées avec une forte activité de dégradation du PHE, puisque quatre des isolats dégradant le mieux le PHE dégradent aussi le CHY et trois d'entre eux, le BAP.

La seconde approche utilisée pour l'isolement de microorganismes a misé sur la croissance de ceux-ci sur différents milieux de culture et a mené à l'obtention de 44 types morphologiques différents en cultures pures. Parmi ces types morphologiques, 17 provenaient du milieu TSA 10%, 17 du milieu R2A et 10 du milieu BHY. Tous les isolats ont été testés en culture liquide pour connaître leur spectre de dégradation des HAP et, parmi les 44 types, dix différents ont montré de la dégradation. Neuf types morphologiques différents ont produit des zones claires suite à la vaporisation des HAP PHE et/ou PYR, certains d'entre eux produisant aussi un pigment brun. Aucune zone claire ou pigment n'a été observé suite aux vaporisations par le FLU, le CHY et le BAP. Tous les isolats ayant démontré de la dégradation des HAP en culture liquide ont été étudiés plus en détail. Les résultats de la caractérisation préliminaire des 10 isolats dégradant les HAP sont présentés au tableau 3.

**Tableau 3 : Caractérisation préliminaire de dix isolats différents, quant à leur coloration de Gram, vitesse de croissance, réaction aux tests d'oxydase et de catalase, spectre de dégradation des HAP (quantités initiales de 79, 106, 36, 96 et 16 mg/L pour le PHE, le PYR, le CHY, le BAP et le PER, respectivement) et vaporisation des HAP PHE et PYR.**

Isolat	Gram <sup>1</sup>	Vitesse de croissance <sup>2</sup>	Oxydase	Catalase	Dégradation des HAP (%) <sup>3</sup>					Vaporisation <sup>4</sup>	
					PHE	PYR	CHY	BAP	PER	PHE	PYR
B1	+, cB c	Lente	+	-	100	100	100	19	0	+	+
B3	-, cB s	Rapide	+	+	100	24	100	0	0	+	P
B21	+, cB a	Très rapide	+	-	100	58	100	0	0		
B26	+, cB c	Lente	+	-	100	100	36	0	0	+	+
B29	+, C c	Lente	+	-	100	100	22	0	0	+	Nd
B44	+, C s	Moyenne	+	-	100	17	57	0	0	+	P
B48	+, C s	Moyenne	+	+	100	15	44	0	0	+	
B50	+, C c	Rapide	+	-	100	23	100	0	0	+	+ P
B51	-, cB c	Rapide	+	+	100	100	100	22	0	+	+ P
B57	-, C c	Lente	+	-	70	0	0	0	0	+	P

<sup>1</sup> cB = coccobacille, C = cocci, cellules c = disposées en chaîne, s = seules, a = disposées en amas

<sup>2</sup> Estimée sur milieu TSA 10%. Croissance très rapide = en moins de 24 h, rapide = en moins de 72 h, moyenne = entre 3 et 5 jours, lente = en plus de 5 jours

<sup>3</sup> Indique le pourcentage des HAP dégradés par les isolats en 30 jours.

<sup>4</sup> + = formation d'une zone claire, P = production d'un pigment brun, Nd = résultat non déterminé

Ces dix isolats microbiens sont différents puisqu'ils ont répondu différemment aux tests auxquels ils ont été soumis. Leurs réactions aux tests de Gram et de catalase, de même que leur vitesse de croissance ont varié d'un isolat à l'autre. Cependant, il est intéressant de noter que tous les isolats étudiés ont donné une réponse positive au test de l'oxydase. Enfin, leurs spectres de dégradation passent de la dégradation du PHE uniquement (isolat B57) à la dégradation de tous les HAP sauf le PER (isolats B1 et B51). La vaporisation de PHE sur les géloses a conduit à la formation de zones claires autour de tous les types de colonies, sauf celles de l'isolat B21. La vaporisation de PYR a occasionné la formation de zones claires dans deux cas (isolats B1 et B26), la production d'un pigment brun colorant les colonies dans trois cas (isolats B3, B44 et B57), l'occurrence de ces deux phénomènes dans deux cas (isolats B50 et B51) ou aucun de ces phénomènes dans deux cas (isolats B21 et B48). La figure 8 illustre un cas de production du pigment brun par les colonies de l'isolat B51 et la formation de zone claire autour de celles-ci.



**Figure 8 : Formation d'une zone claire dans un film de PYR autour d'une colonie de l'isolat B51 et production d'un pigment brun. Halo et pigment apparents après 7 jours (incubation à 25°C, à l'obscurité).**

Les 10 isolats ont été incubés en présence d'indole afin de détecter l'activité de l'enzyme NAP dioxygénase, mais tous ont produit un résultat négatif à ce test. En ce qui concerne la morphologie des colonies des isolats, trois descriptions différentes ont été observées et sont rapportées au tableau 4.



**Tableau 4 : Description morphologique des colonies des dix isolats décrits au tableau 3.**

Isolats	Description des colonies <sup>1</sup>
B1, B3, B26, B44, B48, B50, B51, B57	Coloration jaune, forme ronde, contour régulier, diamètre de 0,5 à 1 mm, texture lisse, plates, légèrement translucides à opaques
B21	Coloration jaune-verte, forme ovoïde, contour régulier, diamètre de 3 mm, texture lisse, plates, translucides
B29	Coloration blanche, forme ronde, contour irrégulier, diamètre de 1 mm, texture rugueuse, plates, translucides

<sup>1</sup>sur milieu TSA 10%.

La diversité de la morphologie des colonies des dix isolats dégradant les HAP s'est avérée très limitée, huit d'entre eux étant plutôt semblables (tableau 4). Les autres caractéristiques de ces isolats, telles que leur réaction à la coloration de Gram, au test de catalase et lors de la vaporisation des HAP, de même que leur vitesse de croissance sur milieu TSA 10% (voir tableau 3), devaient davantage permettre de différencier les isolats.

#### 4.3.2 Caractérisation de quatre isolats dégradant les HAP

D'autres tests de caractérisation ont été effectués sur quatre des dix isolats présentés au tableau 3, les isolats B1, B21, B44 et B51. Ceux-ci ont été choisis en fonction de diverses caractéristiques les distinguant les uns des autres (réaction à la coloration de Gram, au test de catalase, à la vaporisation de HAP, morphologie de colonies et spectre de dégradation des HAP). Les tests effectués ont porté notamment sur leur température de croissance optimale, leur capacité de croître à 4 et à 42°C, ou encore lorsque le NAP est l'unique source de carbone et d'énergie présente, ainsi que l'ordre dans lequel les isolats dégradent les HAP. La comparaison qualitative des cinétiques de dégradation des HAP par les quatre isolats dans des systèmes biphasiques dont la phase aqueuse variait a aussi été effectuée. Les quatre phases aqueuses testées étaient composées des milieux BH avec extrait de sol, BHY, TSB et TSB 10%. Les résultats obtenus sont compilés au tableau 5.

**Tableau 5 : Caractérisation des isolats B1, B21, B44 et B51, en ce qui a trait à différentes propriétés de croissance et de dégradation des HAP.**

Isolat	Température de croissance <sup>1</sup>			Croissance avec vapeurs de NAP <sup>2</sup>	Séquence de dégradation des HAP <sup>3</sup>	Performances de dégradation avec les milieux testés <sup>4</sup>
	Optimale	4°C	42°C			
B1	28°C	-	-	+	PHE, CHY et PYR	BH + ext., TSB 10%, BHY, TSB
B21	37°C	+	-	-	PHE, CHY, PYR	BH + ext., BHY, TSB et TSB 10%
B44	28°C	+	-	+	PHE, CHY et PYR	BHY, TSB, TSB 10%, BH + ext.
B51	28°C	-	-	-	PHE, PYR, CHY	BH + ext. et TSB 10%, BHY, TSB

<sup>1</sup> sur milieu gélosé R2A, en sept jours. - = pas de croissance, + = croissance

<sup>2</sup> sur milieu gélosé BHA, en sept jours. - = pas de croissance, + = croissance

<sup>3</sup> en culture biphasique contenant du BH et de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol)

<sup>4</sup> du milieu permettant la dégradation la plus complète des HAP au milieu le moins bon (tous HAP confondus), essais d'une durée de 40 jours. BH + ext. = milieu BH contenant de l'extrait de sol

La température optimale de croissance des isolats a été de 28°C sauf dans le cas de l'isolat B21, qui a démontré une croissance plus rapide et supérieure à 37°C. Seuls les isolats B21 et B44 ont démontré une croissance à 4°C, celle-ci est toutefois demeurée faible et très lente (apparition de la croissance après 6 jours). Aucun des quatre isolats n'a crû à 42°C. Les isolats B1 et B44 ont effectué une faible croissance lorsque le NAP en vapeurs était la seule source de carbone et d'énergie disponible, alors que les isolats B21 et B51 n'ont pas pu croître dans ces conditions.

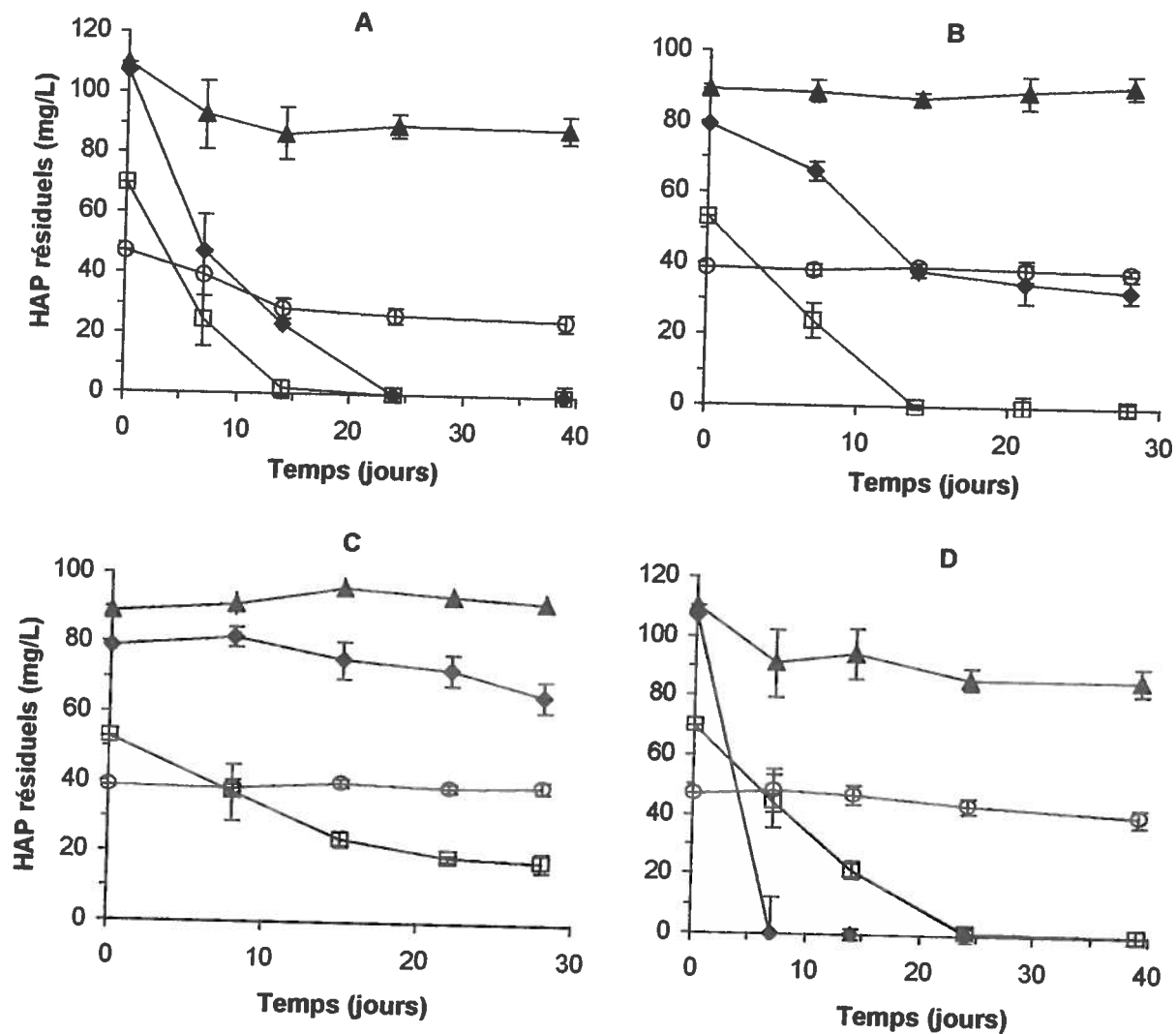
Il a été noté que les quatre isolats ne dégradent pas nécessairement les HAP selon le même ordre. En effet, de façon reproductible, les isolats B1 et B44 ont d'abord effectué la dégradation de la totalité du PHE présent, puis ont dégradé simultanément le PYR et le CHY, en dégradant plus efficacement ce dernier. L'isolat B21 a pour sa part dégradé consécutivement le PHE, le CHY, puis le PYR. Enfin, l'isolat B51 a quant à lui adopté la séquence de dégradation PHE, PYR et, en dernier lieu, CHY. Il est à remarquer que les quatre isolats ont tous d'abord dégradé complètement le PHE présent avant de s'attaquer aux autres HAP. Le BAP a été dégradé simultanément au PYR et au CHY par les isolats B1 et B51 (donnée non présentée au tableau 5).

Les performances de dégradation des HAP obtenues avec différents milieux composant la phase aqueuse dans le système biphasique ont varié selon les isolats. En général, le milieu BH avec extrait de sol a permis les meilleures performances sauf dans le cas de l'isolat B44, où ce milieu a

été le moins bon des quatre milieux testés. Dans l'ensemble, le milieu TSB est celui qui s'est avéré le moins propice à la dégradation des HAP. Pour les isolats B1 et B51, les milieux BH avec extrait de sol et TSB 10% sont les seuls à avoir permis la dégradation de tout le PHE, le PYR et le CHY présents (données non présentées). L'isolat B21 n'a connu de dégradation des HAP que dans les milieux BH avec extrait de sol et BHY, où tout le PHE et le CHY ont été dégradés et où le PYR a été seulement partiellement dégradé. L'isolat B44 a, quant à lui, connu une dégradation de tout le PHE et le CHY présents dans les milieux BHY, TSB et TSB 10% (dégradation plus lente dans ce dernier milieu), ainsi qu'une dégradation partielle du PYR. Aucun des isolats n'a produit de biosurfactants au cours de ces essais (tension de surface mesurée  $> 30$  mN/m), et ce, pour toutes les phases aqueuses testées.

Les cinétiques de dégradation des HAP par les isolats B1, B21, B44 et B51 dans un système biphasique dont la phase aqueuse était constituée d'extrait de sol sont présentées à la figure 9. Le PYR a été dégradé le plus efficacement par l'isolat B51, puis par l'isolat B1. Sa dégradation par les isolats B21 et B44 n'a pas été complète. Les meilleures performances de dégradation du CHY ont été observées par les isolats B1 et B21, puis par l'isolat B51. Ce HAP n'a cependant pas été dégradé complètement par l'isolat B44. Tel que discuté plus tôt, le BAP n'a pas connu beaucoup de dégradation, à peine 20% par les isolats B1 et B51 et aucune dégradation par les isolats B21 et B44. Le PER n'a quant à lui pas été dégradé par les isolats étudiés.

L'identité des quatre isolats a été déterminée par séquençage de l'ADNr 16S, dans le laboratoire du Dr Richard Villemur (INRS-Institut Armand-Frappier). Les résultats du séquençage indiquent que l'isolat B1 se rapproche de l'espèce *Mycobacterium gilvum* (99% d'homologie de séquence), que l'isolat B21 est fortement homologue à l'espèce *Microbacterium esteraromaticum* (98% d'homologie) et que les isolats B44 et B51 appartiennent vraisemblablement au genre *Porphyrobacter* (96% d'homologie).



**Figure 9 : Cinétiques de dégradation des HAP par les isolats B1, B21, B44 et B51 dans un système biphasique.** Cinétiques de dégradation des HAP dans un système biphasique contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol) par les isolats A) B1, B) B21, C) B44 et D) B51, et contenant les HAP PYR (◆), CHY (◻), BAP (▲), et PER (○). Les pertes abiotiques ont été soustraites des courbes pour chacun des HAP.

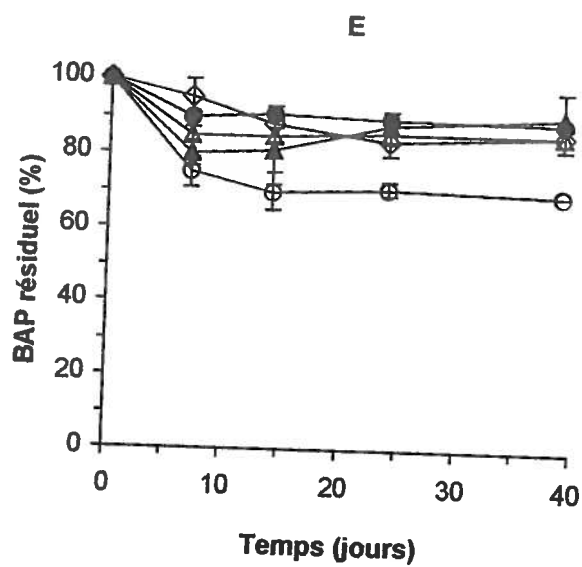
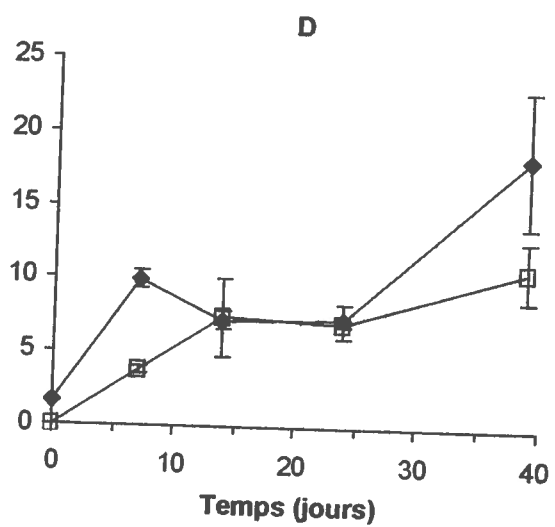
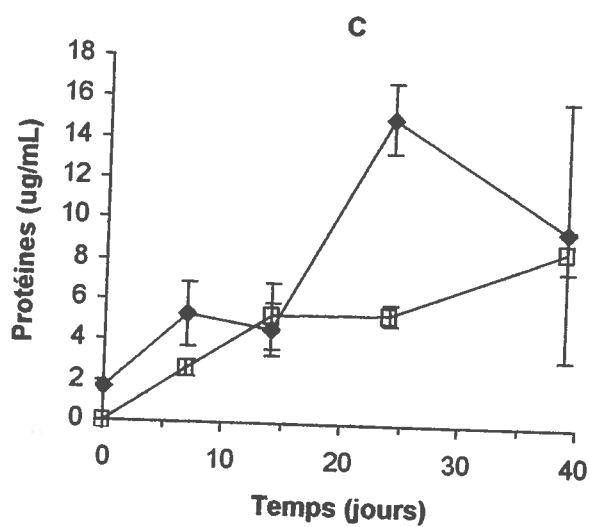
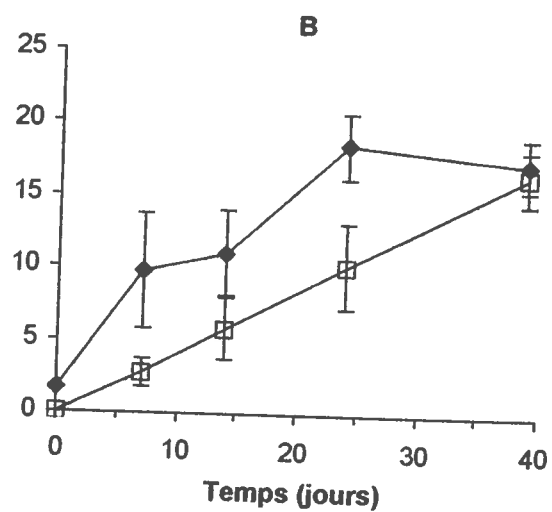
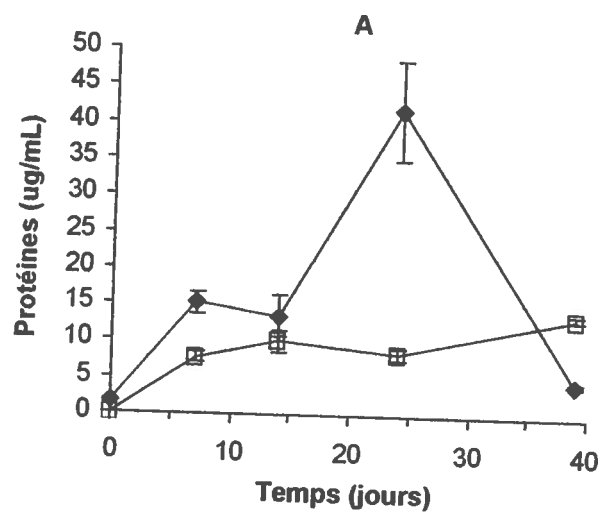
#### 4.3.3 Étude de la localisation des isolats B1, B21, B44 et B51 dans le système biphasique

Les isolats B1, B21, B44 et B51 ont fait l'objet d'une étude visant à élucider leur localisation dans le temps dans le système biphasique, afin de déterminer si certains microorganismes étaient plus adhérents à l'huile de silicone que d'autres et si les cellules se déplaçaient entre la phase aqueuse et l'interface au fil de l'expérience. Les quantités relatives de cellules présentes à divers moments dans la phase aqueuse et à l'interface des phases liquides a été évaluée par détermination des protéines cellulaires totales.

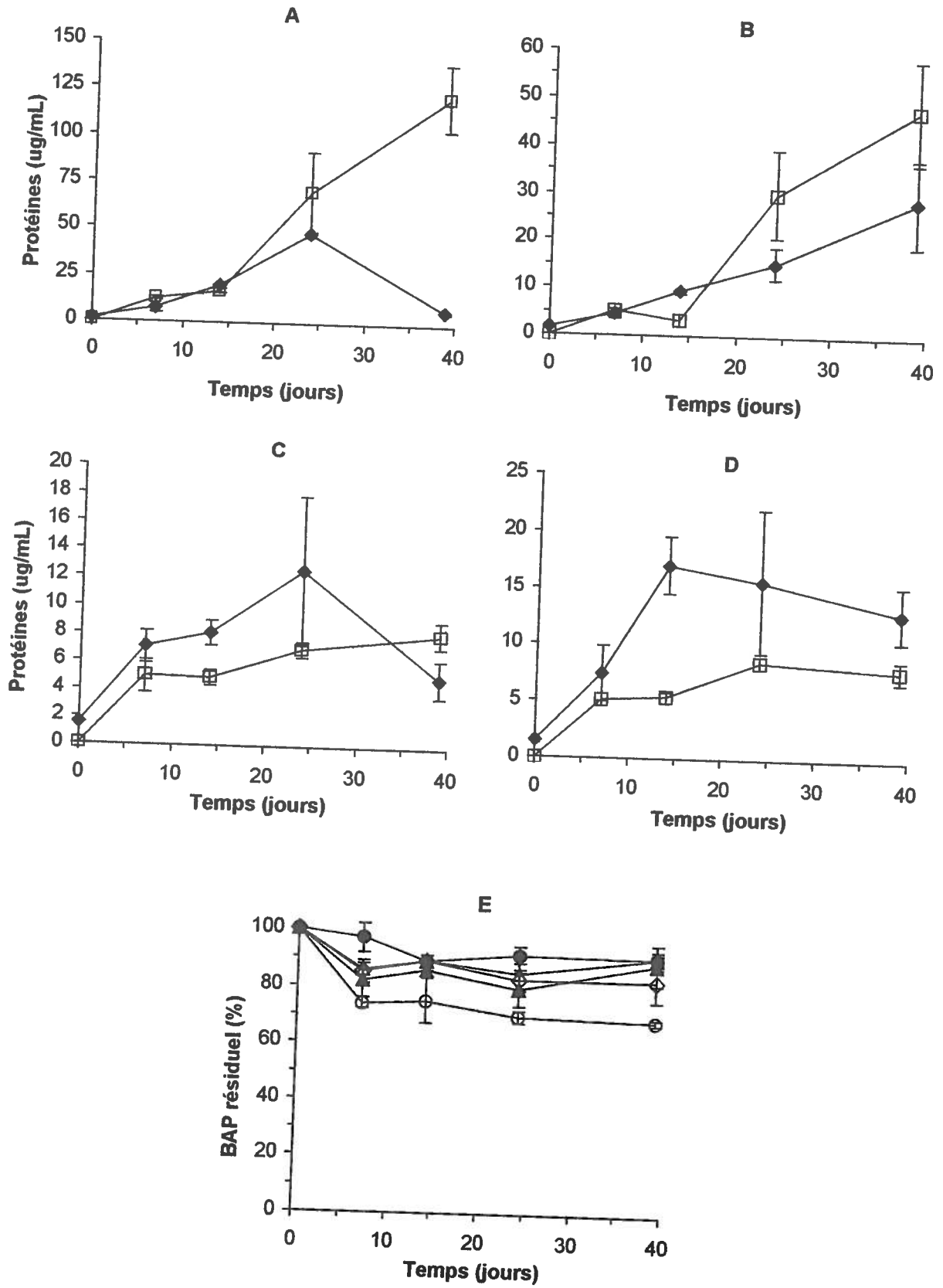
La dégradation du BAP et la variation d'hydrophobicité des cellules dans le temps ont d'abord été étudiées pour les isolats B1 et B51. Le BAP pouvait se trouver en présence de NAP, de PHE, être seul ou faire partie d'un mélange de HAP HPM. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 10 (isolat B1) et 11 (isolat B51).

Pour l'isolat B1, la croissance a été légèrement plus importante dans la phase aqueuse qu'à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe, et ce, tout au long de l'expérience. Les concentrations de protéines cellulaires dosées ont, en général, augmenté au fil du temps. La concentration de protéines la plus importante a été atteinte dans la phase aqueuse des cultures contenant du BAP et du NAP et a été de l'ordre de 40  $\mu\text{g/mL}$ , tandis qu'elle était de 15 à 20  $\mu\text{g/mL}$  dans la phase aqueuse des autres types de cultures. Les concentrations de protéines cellulaires retrouvées à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe ont été dans le même ordre de grandeur pour tous les types de cultures, soit d'environ 10  $\mu\text{g/mL}$ . Une dégradation de 20% du BAP est survenue dans les cultures où ce dernier faisait partie d'un mélange de HAP HPM (figure 10 E). Le BAP a été dégradé principalement dans les premiers 7 jours de l'expérience, le CHY et le PYR étant complètement consommés en 14 et 21 jours, respectivement (voir figure 9 A). Les autres cultures n'ont, à toute fin pratique, pas connu de dégradation du BAP.

Pour l'isolat B51, les cultures où le BAP était en présence de NAP ou de PHE ont démontré plus de croissance à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe que dans la phase aqueuse (figure 11 A et B), alors que les cultures où le BAP était présent seul ou faisant partie d'un mélange de HAP HPM ont connu plus de croissance dans la phase aqueuse qu'à l'interface (figure 11 C et D). En général, les concentrations de protéines cellulaires ont augmenté en cours d'expérience. La plus grande concentration de protéines a été notée à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe des cultures contenant du BAP et du NAP et a été de l'ordre de 125  $\mu\text{g/mL}$ , tandis qu'elle était de 50  $\mu\text{g/mL}$  à l'interface des deux phases liquides des cultures contenant du BAP et du PHE et



**Figure 10 : Localisation de l'isolat B1 dans le système biphasique dans le temps.** Quantification des protéines cellulaires retrouvées à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe (□) et dans la phase aqueuse (contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol), ◆), dans des cultures où le BAP était présent A) avec du NAP, B) avec du PHE (ajouts multiples), C) seul et D) faisant partie d'un mélange de HAP HPM. En E), dégradation du BAP (quantité initiale variant entre 90 et 110 mg/L) dans les cultures où celui-ci était présent conjointement avec du NAP (▲) ou du PHE (◇), seul (Δ) ou dans un mélange de HAP HPM (○). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).





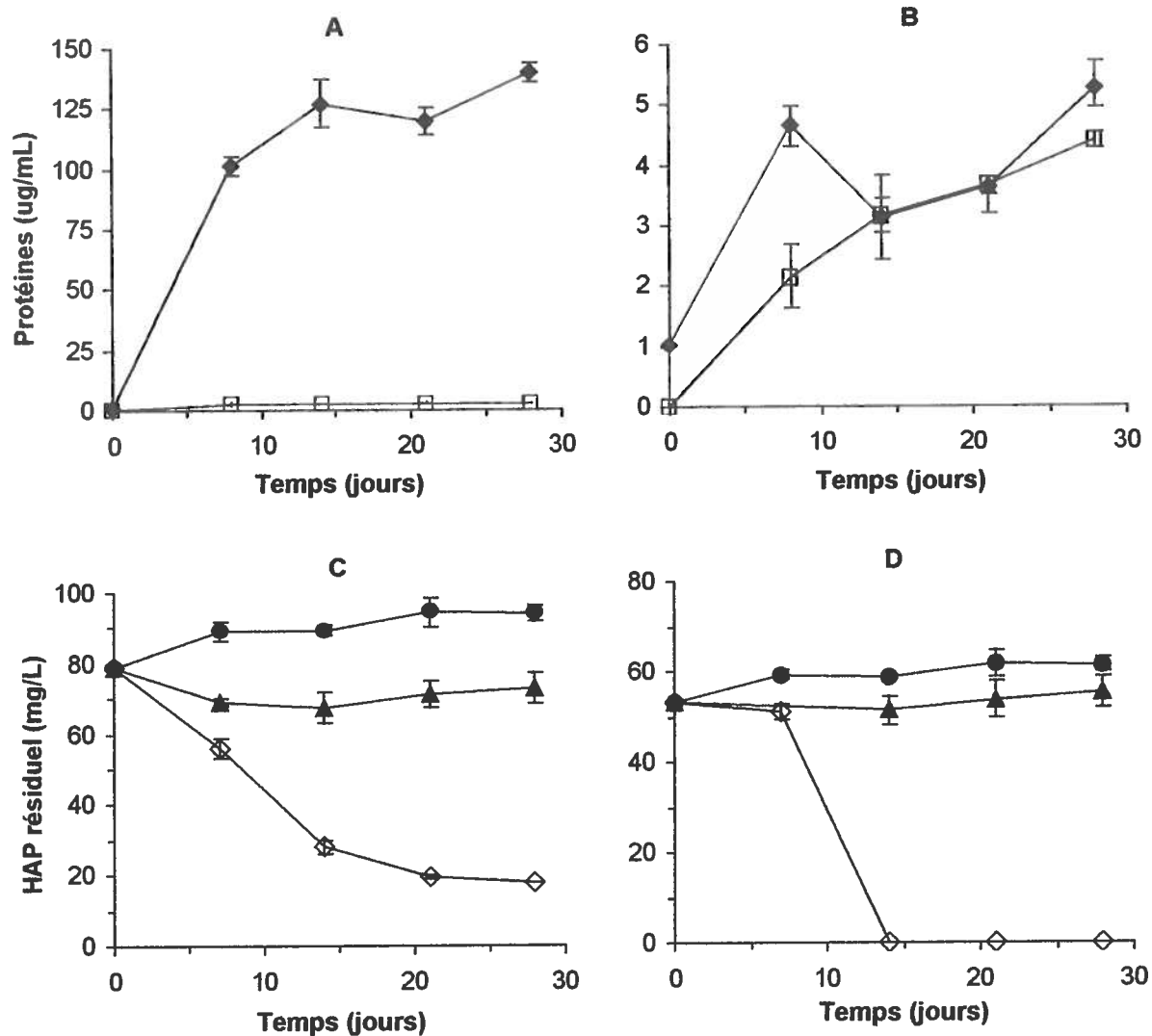
**Figure 11 : Localisation de l'isolat B51 dans le système biphasique dans le temps.** Quantification des protéines cellulaires retrouvées à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe (□) et dans la phase aqueuse (contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol), ◆), dans des cultures où le BAP était présent A) avec du NAP, B) avec du PHE (ajouts multiples), C) seul et D) faisant partie d'un mélange de HAP HPM. En E), dégradation du BAP (quantité initiale variant entre 90 et 110 mg/L) dans les cultures où celui-ci était présent conjointement avec du NAP (▲) ou du PHE (◇), seul (△) ou dans un mélange de HAP HPM (○). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).

d'environ 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  à l'interface des phases liquides des autres types de cultures. Les concentrations de protéines retrouvées dans la phase aqueuse ont été de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans les cultures contenant du BAP et du NAP, de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans les cultures contenant du BAP et du PHE et d'environ 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans les cultures contenant le BAP seul ou faisant partie d'un mélange de HAP HPM. Comme dans le cas de l'isolat B1, une dégradation de 20% du BAP a été observée dans les cultures où ce dernier était présent dans un mélange de HAP HPM (figure 11 E). La majeure partie de la dégradation du BAP a été observée durant les 7 premiers jours de l'expérience. Le PYR a été complètement dégradé durant cette période, alors que le CHY l'a été en 21 jours (figure 9 D). Aucune dégradation significative du BAP n'a été observée dans les autres cultures.

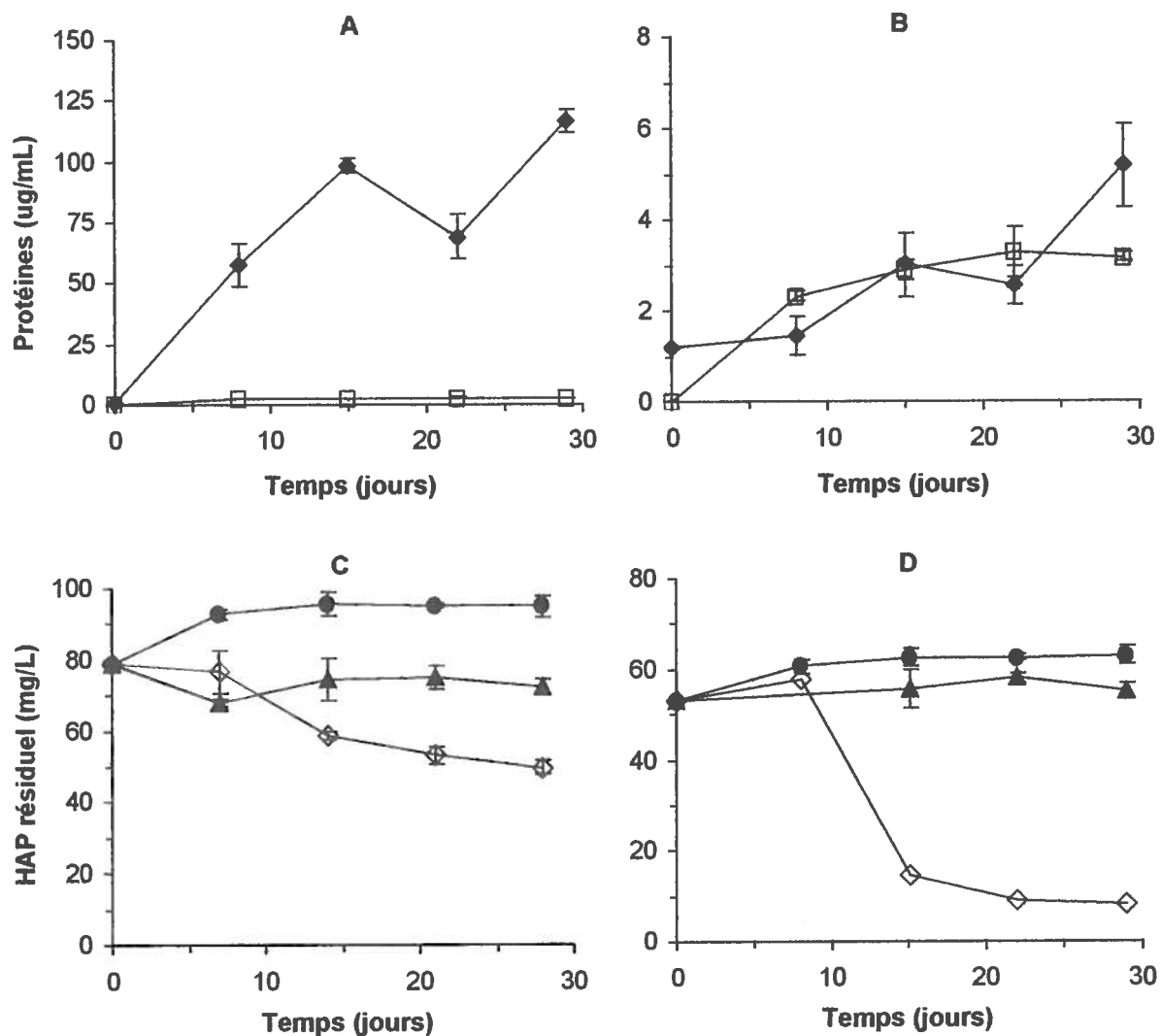
La dégradation du PYR et du CHY et la variation de localisation des cellules des isolats B21 et B44 dans le temps ont aussi été étudiées. Le PYR et le CHY ont été choisis parce qu'ils étaient mieux dégradés par ces isolats que le BAP, même lorsque celui-ci était en présence d'autres HAP pouvant améliorer sa dégradation. Dans toutes les cultures de l'expérience, le PYR et le CHY faisaient partie d'un mélange de HAP HPM, pouvant être en présence de NAP ou non. Les résultats obtenus sont présentés aux figures 12 (isolat B21) et 13 (isolat B44).

L'isolat B21 a connu beaucoup plus de croissance dans la phase aqueuse des cultures contenant du NAP qu'à leur interface, avec près de 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  et 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéines, respectivement (figure 12 A). Les cultures ne contenant pas de NAP ont produit environ 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéines, à l'interface tout comme dans la phase aqueuse (figure 12 B). Toutes les cultures ont vu leur quantité de protéines cellulaires augmenter, au moins faiblement, au fil de l'expérience. En ce qui concerne la dégradation des HAP, seules les cultures dans lesquelles le NAP était absent ont connu une dégradation importante du PYR et du CHY, en 14 jours. Au contraire, les cultures dans lesquelles le NAP était présent n'ont pas connu de dégradation des HAP au cours des 28 jours de l'expérience.

Dans le cas de l'isolat B44, tout comme pour l'isolat B21, la croissance la plus forte est survenue dans les cultures contenant du NAP, particulièrement dans leur phase aqueuse, où la concentration de protéines cellulaires a atteint 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (figure 13 A). À l'interface des phases aqueuse et hydrophobe de ce type de cultures, ainsi qu'à l'interface et dans la phase aqueuse des cultures ne contenant pas de NAP, une concentration de 3 à 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéines a été atteinte. Seules les cultures ne contenant pas de NAP ont connu une dégradation du PYR et du CHY. Dans



**Figure 12 : Localisation de l'isolat B21 dans le système biphasique dans le temps.** Quantification des protéines cellulaires retrouvées à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe (◻) et dans la phase aqueuse (contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol), ◆), dans des cultures où le PYR et le CHY étaient présents dans un mélange de HAP HPM A) contenant du NAP ou B) sans NAP. Cinétiques de dégradation des HAP C) PYR et D) CHY, dans les cultures où le NAP était présent (▲) et lorsqu'il était absent (◇). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).



**Figure 13 : Localisation de l'isolat B44 dans le système biphasique dans le temps.** Quantification des protéines cellulaires retrouvées à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe (□) et dans la phase aqueuse (contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol), ◆), dans des cultures où le PYR et le CHY étaient présents dans un mélange de HAP HPM A) contenant du NAP ou B) sans NAP. Cinétiques de dégradation des HAP C) PYR et D) CHY, dans les cultures où le NAP était présent (▲) et lorsqu'il était absent (◇). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).

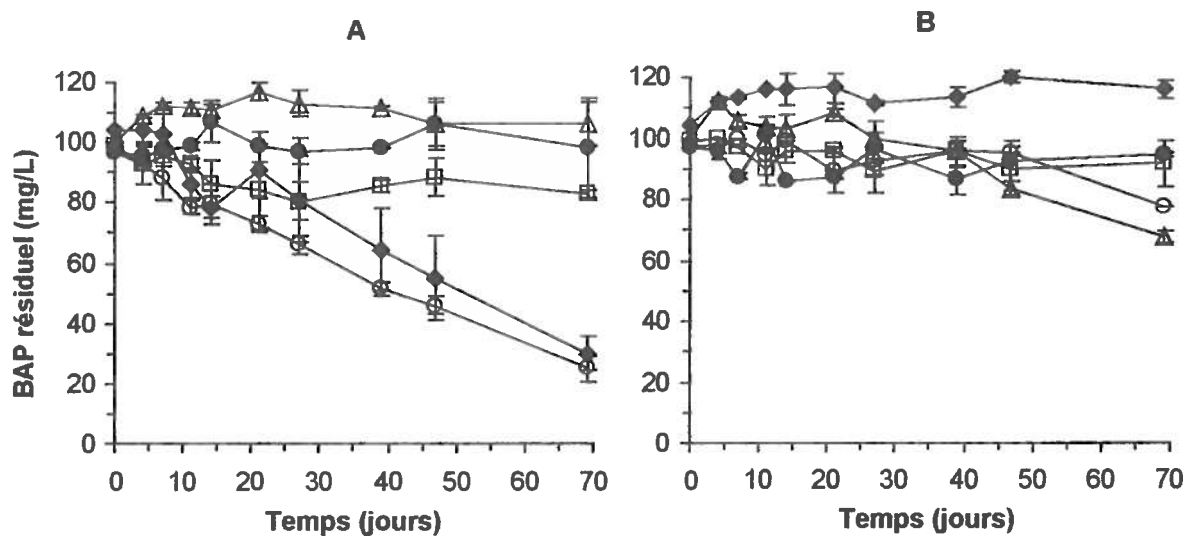
ces cultures, la dégradation de ces HAP est devenue beaucoup plus lente après 14 jours et n'a pas été complète en 28 jours. Les cultures dans lesquelles le NAP était présent n'ont pas connu de dégradation significative des HAP.

#### 4.3.4 Effet du PYR et du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51

Des essais préliminaires avaient laissé entrevoir la possibilité d'un effet positif du PYR et/ou du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51. Cette expérience avait pour but de vérifier ces résultats et de déterminer lequel, entre le PYR et le CHY, exerçait un effet positif sur la dégradation du BAP et si cet effet pouvait être synergique lorsque le PYR et le CHY étaient tous deux présents. La figure 14 présente les résultats obtenus pour les isolats B1 (A) et B51 (B).

Pour l'isolat B1, seuls deux types de cultures ont connu une dégradation marquée du BAP : les cultures contenant du PYR et celles contenant du PYR et du CHY (figure 14 A). Dans les premières, la dégradation observée après 69 jours était de l'ordre de 71%, tandis qu'elle était de 75% dans les secondes cultures. Les autres cultures de l'expérience n'ont pas connu de dégradation significative. L'isolat B51 n'a dégradé le BAP dans aucune des cultures étudiées, sinon légèrement dans celles contenant du CHY et du BAP (33%) et du PYR, du CHY et du BAP (23%), vers la fin de l'expérience (figure 14 B).

Selon les résultats de cette expérience, la présence de HAP HPM peut avoir des effets positifs sur la dégradation d'autres HAP HPM, mais ces effets varient en fonction des HAP et des isolats impliqués.



**Figure 14 : Effet du PYR et du CHY sur la dégradation du BAP par les isolats B1 et B51. Cinétiques de dégradation du BAP A) par la souche B1 et B) par la souche B51, dans des cultures contenant de l'extrait de sol (équivalent à 5% de sol) et où le BAP se trouvait seul (□), avec du PYR (◆), avec du CHY (Δ) ou avec du PYR et du CHY (○). Les témoins abiotiques sont représentés par le symbole (●).**

**5**  
***Discussion***

## **5.1 Étude et optimisation de la phase hydrophobe**

### **5.1.1 Comparaison de la solubilité des HAP seuls et en mélange**

Benachenhou (1998) a déterminé la solubilité du PHE, du PYR, du CHY et du BAP dans l'huile de silicone 20 cSt, lorsque ces HAP étaient seuls. Il a obtenu des solubilités de  $5021 \pm 210$ ,  $1849 \pm 89$ ,  $71 \pm 8$  et  $245 \pm 19$  mg/L, respectivement. Les données obtenues lors des présents essais (voir tableau 1, section 4.1.1) révèlent des écarts de 5, 28, 33 et 3% avec ces résultats, pour le PHE, le PYR, le CHY et le BAP, respectivement. Ces écarts sont sans doute attribuables à des variations dans les protocoles et les manipulations entre nos expériences et celles de Benachenhou, telles que la température, l'erreur reliée à la méthode d'analyse, la vitesse d'agitation des mélanges et le temps d'agitation, qui n'a pas nécessairement été le même entre les deux expériences.

Dans le cas du PER, la solubilité mesurée dans l'huile de silicone est demeurée semblable lorsque celui-ci était le seul HAP présent et lorsqu'il faisait partie d'un mélange de cinq HAP, où tous étaient en excès. Cependant, sa solubilité a augmenté de 36% lorsqu'il faisait partie d'un mélange de cinq HAP, mais qu'il était le seul HAP en excès.

Selon nos résultats, la solubilité des HAP dans l'huile de silicone s'avère être de 5000 à 60 000 fois supérieure à leur solubilité dans l'eau (voir annexe 3). De même, la solubilité des HAP étudiés dans l'huile de silicone est proportionnelle à leur solubilité dans l'eau (Benachenhou, 1998). La solubilité des HAP varie en fonction de la phase dans laquelle ils se trouvent et des autres HAP ou composés présents. Cet effet de cosolubilisation des HAP, peu documenté jusqu'à maintenant, se doit d'être considéré. La possibilité de cosolubilisation des HAP dans d'autres phases liquides que l'huile de silicone est aussi probable. Ces résultats ont des implications qui seront discutées plus loin dans ce chapitre.

### **5.1.2 Proportion d'huile de silicone**

Dans la littérature, les auteurs étudiant la dégradation de polluants en système biphasique ont utilisé des proportions très différentes de phase organique, allant de 0,001 (Efroymsen et Alexander, 1991) à 60% (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993). Lors de nos essais, les résultats obtenus ont indiqué que plus la proportion d'huile de silicone 20 cSt était importante, moins bons étaient les rendements de dégradation des HAP testés (voir figure 3, section 4.1.2). Cet effet était surtout marqué pour le BAP, mais demeurait modéré (8 à 15% d'augmentation de dégradation pour les cultures contenant 10% d'huile de silicone par rapport à celles en contenant 30%).



Labare et Alexander (1995) ont observé cette même tendance, alors que d'autres auteurs ont observé la tendance inverse (Efroymsen et Alexander, 1991, Ortega-Calvo et Alexander, 1994). Enfin, Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) ont démontré qu'un pourcentage optimal de phase hydrophobe pouvait être atteint et que les rendements de dégradation diminuaient à des proportions de phase hydrophobe plus élevées ou plus faibles que celui-ci.

Pour le consortium étudié, la proportion optimale de phase hydrophobe (parmi celles testées) se situait à 10%. Puisque les rendements de dégradation des HAP ont diminué lorsque la proportion de la phase hydrophobe était plus élevée que 10%, il est possible que la diffusion de l'oxygène ait été entravée. Cependant, selon Ascon-Cabrera et Lebeault (1995a), le taux de transfert de l'oxygène n'est pas limité par l'huile de silicone, même lorsqu'une proportion de 60% d'huile est utilisée. De plus, la solubilité de l'oxygène dans l'hexadécane est plus élevée que dans l'eau, minimisant les problèmes d'aération lorsque cette phase est employée (Ju et Ho, 1989).

Les trois hypothèses suivantes peuvent être apportées pour expliquer nos résultats. La surface d'échange entre les phases aqueuse et hydrophobe a augmenté à mesure que la proportion d'huile de silicone augmentait dans le système, favorisant la dégradation par les microorganismes de l'interface et le transfert des HAP dans la phase aqueuse. Par contre, lorsque de fortes proportions d'huile de silicone étaient utilisées, l'agitation pouvait s'avérer insuffisante et limiter la dispersion de la phase hydrophobe dans la phase aqueuse. En effet, selon Déziel, Comeau et Villemur (1999), la proportion de phase hydrophobe optimale est influencée par la forme de la fiole, la vitesse d'agitation et les propriétés de la phase hydrophobe (densité, viscosité). Une augmentation de l'agitation aurait pu permettre une meilleure distribution de la phase hydrophobe dans les cultures, un meilleur taux de transfert et une plus grande surface disponible pour la colonisation par les microorganismes adhérant à l'huile de silicone. Une amélioration des cinétiques de dégradation aurait alors possiblement été obtenue.

La deuxième explication possible est relative au fait que la différence de concentration des HAP entre les phases aqueuse et hydrophobe a diminué à mesure que la proportion d'huile de silicone augmentait dans les fioles. En effet, puisque la quantité de HAP demeurait constante dans les différentes fioles utilisées, le taux de transfert des HAP dans l'eau ne pouvait que diminuer à mesure que la proportion d'huile augmentait, ce qui se reflétait sur les cinétiques de dégradation observées. Pour éviter cet effet, la concentration des HAP dans l'huile aurait dû demeurer constante entre tous les types de fioles. Ces résultats suggèrent néanmoins qu'une diminution du

taux de transfert des HAP a affecté leur cinétique de dégradation et que les microorganismes présents dans la phase aqueuse, et non ceux de l'interface, étaient principalement responsables de la dégradation des HAP observée par le consortium à ce moment. Finalement, la dernière explication pourrait être que les cultures contenant une plus grande proportion de phase hydrophobe contenaient moins de phase aqueuse (dans laquelle se retrouvent les nutriments) et que la moins bonne performance observée soit due à cette carence nutritive.

Suite aux résultats obtenus, lesquels montrant que seule la dégradation du BAP était affectée (faiblement) par le pourcentage d'huile utilisé, la proportion de phase hydrophobe de 20% a été maintenue pour la suite des essais expérimentaux par souci de similitude avec les expériences précédemment effectuées et pour comparaison avec les expériences de Marcoux (1998) et de Lainesse (2000). Cette proportion de phase hydrophobe a été jugée intermédiaire et permettant des cinétiques de dégradation tout de même fort acceptables.

## **5.2 Effet des HAP sur la dégradation d'un mélange de HAP HPM**

### **5.2.1 Remplacement du sol par de l'extrait de sol**

Dans les cultures expérimentales, le seul paramètre qui ait subi une modification en cours d'étude est l'utilisation de sol/extrait de sol. La première expérience (voir section 4.2.1) a été effectuée avec du sol stérile, mais celui-ci a ultérieurement été remplacé par de l'extrait de sol stérile. La stérilité de ces deux composantes était primordiale car le sol est porteur d'une importante charge microbienne qui, non tuée, aurait pu interférer de plusieurs façons avec la dégradation des HAP : compétition de la flore indigène avec le consortium pour les nutriments, l'espace, l'oxygène disponible, phénomènes de prédation, production de bactériocines ou d'autres agents inhibiteurs, etc (Shaw et al, 1999).

En plus de détruire toute flore microbienne, la stérilisation à la chaleur du sol et de l'extrait de sol a sans aucun doute aussi altéré un grand nombre de molécules thermosensibles présentes dans le sol. Celles-ci pouvaient être impliquées dans des phénomènes reliés directement ou indirectement à la dégradation des HAP. La stérilisation par la chaleur humide a aussi probablement permis la libération du sol de composés carbonés solubles dans l'eau (matière humique et biomasse tuée), d'ammonium et d'acides aminés (Trevors, 1996), ainsi que de certains ions ( $Mn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ) (Wolf et al., 1989), de façon à ce que l'adsorption des HAP aux particules de sol de l'extrait de sol puisse être influencée par la stérilisation.

Le sol a été remplacé par de l'extrait de sol dans les expériences dans le but principal de réduire les pertes abiotiques de HAP observées. Cela devait permettre de pouvoir mieux observer les phénomènes de biodégradation se produisant dans les fioles, parfois masqués par de très fortes baisses abiotiques de HAP (voir expérience 4.2.1, effet de différentes doses de PHE sur la dégradation du PER). L'expérience 4.2.1.1 a démontré que le sol et l'extrait de sol permettaient d'obtenir des rendements de dégradation comparables, mais que l'extrait de sol minimisait les pertes abiotiques de 10% (PYR) jusqu'à 45% (BAP et PER). Cette information suggère que les HAP s'adsorbent davantage au sol qu'à l'extrait de sol, possiblement dû à la forte présence de matière organique dans le sol (Manilal et Alexander, 1991, Richnow et al., 1995, Carmichael et Pfaender, 1997, Luthy et al., 1997, Löser et al., 1999, Ressler, Kneifel et Winter, 1999). Les auteurs ne s'accordent cependant pas à s'avoir si la taille des particules de sol et la quantité de microporosités qu'elles contiennent sont aussi impliquées dans les phénomènes d'adsorption. Il est néanmoins clair que l'adsorption des HAP est proportionnelle au contenu du sol en matière organique (Providenti, Lee et Trevors, 1993, Kästner et Mahro, 1996). Selon Hugues et al. (1997), l'effet d'adsorption serait plus marqué pour les HAP possédant une grande hydrophobicité et donc une faible solubilité dans l'eau. La figure 5 D (section 4.2.1.1) illustre nettement ces deux tendances, alors que 1) les fioles renfermant le plus de matière organique (contenant du sol ou une forte proportion d'extrait de sol) ont connu les plus grandes pertes abiotiques de PER, 2) le PER étant très hydrophobe. L'effet d'adsorption des autres HAP, mesuré en terme de pertes abiotiques, a été moins marqué (figure 5 A, B et C).

Certains auteurs ont observé des effets positifs sur la biodégradation dus à l'adsorption des HAP sur les particules de sol (Kästner et Mahro, 1996, Laor, Strom et Farmer, 1999) et ont supposé que, dans certains cas, les microorganismes s'y adsorbaient aussi et qu'il en résultait un contact plus étroit entre ceux-ci et les HAP. Cependant, une certaine proportion de l'adsorption des HAP se produit de façon irréversible car des liens covalents sont formés entre les HAP et le sol (Löser et al., 1999), ce qui empêche toute dégradation subséquente des HAP. Cette proportion varie en fonction des HAP, du type de sol et des conditions expérimentales employées. Toutefois, il est à remarquer que, les phénomènes d'adsorption étant proportionnels à l'âge de la contamination (Weissenfels, Klewer et Langhoff, 1992), les expériences effectuées dans le cadre de nos travaux ont surtout montré des phénomènes d'adsorption rapide (et vraisemblablement réversibles) dus à une contamination artificielle.

Dans l'expérience 4.2.1, où du sol a été utilisé, d'importantes pertes abiotiques de PER ont été observées et une extraction du sol a été réalisée afin de retrouver la quantité de PER ne se trouvant plus dans la phase hydrophobe au terme de l'expérience. L'extraction avait pour but de démontrer que le PER était toujours présent dans les fioles, sous forme adsorbée au sol, et que les pertes observées n'étaient pas dues à des phénomènes biologiques, mais bien physico-chimiques. Une adsorption du PER au sol dans des proportions identiques aux pertes enregistrées dans les cultures aurait signifié que ce composé n'était aucunement dégradé par le consortium. Seulement 22% du PER a été retrouvé dans le sol selon la méthode d'extraction utilisée. Plusieurs hypothèses se présentent pour expliquer ce résultat. Des pertes de PER ont peut-être été encourues durant la méthode d'extraction, par exemple lors de l'évaporation sous jet d'azote. Le PER peut aussi s'être adsorbé à d'autres constituants présents dans les fioles, comme les parois ou les cellules, qui n'ont pas été extraites à l'acétate d'éthyle. Stringfellow et Alvarez-Cohen (1999) ont étudié l'adsorption du PHE sur la biomasse et découvert qu'elle variait en fonction des genres bactériens, le groupe des Nocardioformes étant ceux l'adsorbant le plus. Les Nocardioformes incluent entre autres les genres *Mycobacterium*, *Corynebacterium* et *Arthrobacter*, qui sont souvent impliqués dans la dégradation des HAP (Kästner, Breuer-Jammali et Mahro, 1994). Les phénomènes d'adsorption observés par Stringfellow et Alvarez-Cohen étaient reproductibles et, selon les auteurs, ils pourraient être dus à de l'adsorption de surface sur des sites définis (plus nombreux sur les genres possédant une haute affinité d'adsorption) ou à une hydrophobicité de surface élevée. Sachant que le PER est beaucoup plus hydrophobe que le PHE, il est très possible qu'il se soit adsorbé sur la biomasse présente dans les cultures expérimentales, du moins dans une certaine proportion. Finalement, il est possible que le PER ait formé des liens covalents avec le sol, l'empêchant d'être extrait par l'acétate d'éthyle et/ou reconnu par HPLC. Quoique l'extraction réalisée n'ait pas permis de démontrer que le PER quittant la phase hydrophobe s'adsorbait dans sa totalité aux particules de sol, les résultats permettent néanmoins de conclure qu'une partie du PER s'y adsorbe.

### 5.2.2 Effets de HAP FPM sur la dégradation de HAP HPM par le consortium

Les résultats obtenus lors des expériences sur l'effet des HAP FPM sur la dégradation des HAP HPM démontrent qu'un effet est bel et bien présent, mais qu'il peut varier selon les combinaisons de HAP effectuées et les microorganismes impliqués. Selon Bouchez, Blanchet et Vandecasteele (1995a), les HAP, étant des composés homologues, sont très sujets à des interactions entre eux. Les études réalisées avec le consortium indiquent les tendances auxquelles obéissent un grand

nombre de microorganismes du consortium. Le PHE a démontré un effet positif sur la dégradation du BAP, l'effet étant proportionnel à la dose de PHE (voir figure 4 A, section 4.2.1), ce qui laisse croire à des phénomènes d'attaque par cométabolisme. Kanaly et al. (2000) ont aussi obtenu une plus grande dégradation de BAP lorsque la quantité de diésel augmentait, causé par du cométabolisme. Selon Bouchez, Blanchet et Vandecasteele (1995a), le cométabolisme est très répandu chez les microorganismes dégradant les HAP. L'effet positif du PHE observé pourrait aussi résulter d'un accroissement de la population de microorganismes dégradant les HAP, dû à une source de carbone facilement disponible, le PHE (Cullen, Li et Reimer, 1994). Aitken et al. (1997) et Juhasz, Britz et Stanley (1997a) ont aussi observé l'effet positif d'une petite quantité de PHE sur la dégradation du BAP, pour des souches pures de *Pseudomonas saccharophila* et de *Burkholderia cepacia*, respectivement. Dans le dernier cas, le PHE agissait comme un inducteur sur les voies de dégradation plutôt que comme cométabolite. D'autres auteurs ont observé que le HAP avec lequel est incubé un microorganisme peut induire la formation d'enzymes permettant ensuite de dégrader des HAP que le microorganisme n'attaque habituellement pas (Chen et Aitken, 1999, Mahaffey, Gibson et Cerniglia, 1988).

La réduction de dégradation du PYR en présence de NAP et de PHE (voir figure 7 A, section 4.2.4) laisse penser qu'il y a inhibition compétitive chez les microorganismes, soit pour le système de transport des HAP à l'intérieur des cellules (Stringfellow et Aitken, 1995a) ou parce que tous ces HAP sont dégradés par la même voie métabolique et qu'il y a compétition pour l'oxygénase effectuant la première étape de la voie (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995a). En effet, chez certains microorganismes, la large spécificité de substrats s'applique aux premières étapes de la dégradation, alors que les dernières étapes divergent pour différents HAP (Chen et Aitken, 1999). Une autre possibilité est le métabolisme préférentiel (et exclusif) des microorganismes pour les sources de carbone les plus faciles à dégrader parmi celles présentes, en l'occurrence les HAP FPM (Providenti, Lee et Trevors, 1993). La possibilité que les HAP soient dégradés par plus d'une voie et qu'il y ait inhibition de la voie métabolique du PYR par les autres HAP est aussi possible, dans le cas où la régulation des différentes voies de dégradation serait effectuée par un mécanisme commun (Aitken et al., 1997). Enfin, l'accumulation de métabolites toxiques pourrait expliquer le ralentissement de la dégradation du PYR et son arrêt lorsque le PHE était présent (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995a). Une combinaison de ces trois phénomènes est aussi possible pour expliquer les résultats obtenus, puisque divers microorganismes étaient sans doute impliqués dans la dégradation. Plusieurs auteurs ont obtenu des résultats positifs quant à l'effet du NAP et du PHE sur la dégradation du PYR. Geiselbrecht et

al. (1998) ont observé la dégradation du PYR par cométabolisme avec le PHE chez une souche de *Cycloclasticus*. Stringfellow, Chen et Aitken (1995b) ont obtenu une stimulation de la dégradation du PYR lorsque celui-ci était en présence de PHE, chez une souche de *Pseudomonas saccharophila*. Guha, Peters et Jaffé (1999) ont quant à eux observé que le NAP et le PHE n'avaient pas d'effet individuellement sur la dégradation du PYR par un consortium microbien mais que, en mélange, ces deux HAP FPM stimulaient la dégradation du PYR de façon significative. Samantha, Chakraborti et Jain (1999) ont observé l'effet positif d'un mélange de HAP FPM et HPM, dont du PHE, sur la dégradation du PYR chez deux souches (sur quatre) testées, alors qu'aucun effet n'était observé chez les deux autres souches. Notons enfin que, dans nos expériences, le PYR a été dégradé plus rapidement lorsqu'il formait un mélange avec d'autres HAP HPM, ce qui signifie que les autres HAP HPM jouent un rôle de stimulation de la dégradation du PYR plus important que les HAP FPM.

Le NAP a exercé un effet positif sur la dégradation du CHY, après une période de latence (voir figure 7 B). Celle-ci pourrait être due à un engorgement des voies de dégradation ou à un accroissement de toxicité du milieu (dû aux métabolites de dégradation du NAP), cette situation se résorbant par la suite lorsque les métabolites de dégradation du NAP ont été progressivement dégradés par les microorganismes. L'effet positif du NAP suggère que la dégradation de HAP HPM pourrait être co-induite quand la voie de dégradation d'un HAP FPM est induite (Stringfellow, Chen et Aitken, 1995b). Aucune inhibition ou synergisme n'est survenu dans la dégradation du CHY lorsque le PHE était présent, un résultat aussi obtenu par Geiselbrecht et al. (1998) pour une souche de *Cycloclasticus*. Enfin, comme dans le cas du PYR, la dégradation du CHY a été meilleure lorsque des HAP HPM étaient présents. Kelley et Cerniglia (1995) ont quant à eux observé le résultat contraire, où la minéralisation des HAP était réduite lorsque ceux-ci faisaient partie d'un mélange contenant des HAP FPM et HPM. Selon eux, la présence d'un grand nombre de HAP cause des phénomènes de compétition entre les HAP pour les voies de dégradation disponibles. Le résultat contraire observé dans nos expériences indique que les effets d'induction des voies métaboliques et de cométabolisme ont été plus importants que les effets négatifs ayant pu survenir.

Le BAP n'a quant à lui connu d'amélioration de sa dégradation qu'en présence de NAP (voir figure 7 C). Le NAP pourrait avoir induit la voie de dégradation du BAP ou celui-ci pourrait avoir été dégradé par cométabolisme. Des résultats préliminaires avaient déjà montré l'effet positif du NAP sur la dégradation du BAP par le consortium (données non présentées).

L'étude de l'effet du NAP sur la dégradation du PER par le consortium a donné des résultats mitigés (voir figure 6, section 4.2.2). Le contrôle abiotique (sans inoculum) a montré des pertes de 20% du PER, possiblement causées par son adsorption à la matière organique présente dans l'extrait de sol et aux parois des fioles. Les très fortes baisses de PER observées au jour 5 dans les fioles inoculées suggèrent qu'un phénomène abiotique pourrait être responsable de cette diminution et qu'il ne s'agirait pas de biodégradation. La grande biomasse générée par la présence de NAP n'est pas à elle seule responsable des pertes observées, comme le témoignent les pertes similaires obtenues dans les cultures où le NAP était absent. La faible solubilité du PER dans l'huile, et possiblement sa précipitation (formation de cristaux de la quantité résiduelle de HAP) dans les conditions de culture utilisées, pourrait aussi être responsable des pertes observées. En effet, la solubilité du PER dans l'huile de silicone en présence de NAP n'a pas été mesurée au cours des essais de solubilité effectués (voir section 4.1.1) et il n'est donc pas possible d'affirmer qu'elle est la même qu'en absence de NAP. La faible disparition de PER observée subséquemment dans les cultures où celui-ci était présent avec le NAP ou le mélange de HAP HPM incite à croire qu'une dégradation lente du PER aurait eu lieu après les pertes abiotiques initiales. Les cultures dans lesquelles le PER était seul n'ont plus connu de pertes après 10 jours, suggérant que la présence d'autres HAP a favorisé la dégradation du PER par le consortium. Cela pourrait être dû à des phénomènes d'induction et/ou de cométabolisme. Le NAP pourrait aussi avoir permis l'accroissement de la population, facilitant ainsi la dégradation du PER. Des études ultérieures avec du PER marqué au  $^{14}\text{C}$  ou un bilan de masse permettraient de confirmer la dégradation du PER par le consortium.

La période de latence observée dans plusieurs cultures avant le début de la dégradation peut être expliquée de plusieurs façons. Il peut s'agir du temps requis pour que la croissance microbienne soit assez importante pour observer la dégradation (Providenti, Lee et Trevors, 1993, Kanaly et al., 2000), du temps requis pour l'acclimatation des microorganismes à un nouvel environnement, possiblement toxique (Munro et Daugulis, 1996), du temps requis pour dégrader certains substrats inhibiteurs, causant des interactions compétitives de substrats ou une répression des voies de dégradation (Kanaly et al., 2000), d'une période de mortalité cellulaire (Lantz et al., 1997) ou du temps nécessaire à l'induction des enzymes responsables de la dégradation (Churchill, Harper et Churchill, 1999). Comme nous, d'autres auteurs ont observé des périodes de latence de plusieurs jours ou semaines avant le début de la dégradation (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991, Kelley

et Cerniglia, 1991, Churchill, Harper et Churchill, 1999, Kanaly et al., 2000, Meyer et Steinhart, 2000, Van Hamme, Odumeru et Ward, 2000).

### **5.3 Modification de la flore microbienne du consortium dans le temps**

Des cinétiques différentes de dégradation obtenues par le consortium à différents moments au cours des 14 mois où il a été utilisé dans nos travaux suggèrent une évolution de celui-ci au fil des repiquages et une modification dans le temps de la flore microbienne le composant. Le premier exemple concerne la dégradation du PER par le consortium, qui était effectuée à 45% en 30 jours au début des enrichissements des présents travaux et qui a atteint un taux de dégradation nul après 16 repiquages avec du sol stérile (données non présentées). Puisque le consortium était auparavant enrichi en présence de sol non stérile (travaux de Marcoux, 1998), la possibilité que la perte de microorganismes dégradant le PER soit due à la destruction par autoclavage de substrats organiques labiles ou de microorganismes favorisant leur croissance ou survie dans le consortium n'est pas à écarter.

Le second exemple concerne l'effet de la présence constante de PHE sur la dégradation du BAP, qui a été mesuré à deux reprises au cours des expériences, à huit mois d'intervalle. Lors du premier essai, de 65 à 75% de dégradation du BAP avait été obtenu après 50 jours (voir figure 4 A, section 4.2.1). La seconde expérience, au contraire, n'a mené à une dégradation que de 10% de BAP après 30 jours (voir figure 7 C, section 4.2.4). De même, la dégradation du BAP lorsque celui-ci faisait partie d'un mélange de HAP HPM s'est montrée variable. En effet, les résultats de l'expérience 4.1.2 (voir figure 3 C) diffèrent de ceux de l'expérience 4.2.4 (voir figure 7 C), où la dégradation du BAP n'est pas survenue dans les fioles expérimentales contenant le mélange de HAP HPM. Finalement, une émulsion a été observée dans des cultures contenant du NAP et du BAP au cours des premières expériences, mais n'a plus été obtenue par la suite dans des conditions similaires (données non présentées), possiblement parce que les microorganismes responsables ont diminué en nombre dans le consortium ou qu'ils en sont disparus au fil du temps. Il semble donc y avoir eu une modification de la flore microbienne du consortium au fil des repiquages, ce qui rend difficile les comparaisons des résultats entre les expériences. L'augmentation de la fréquence des repiquages pourrait expliquer en partie l'évolution des microorganismes, particulièrement de ceux dégradant le BAP et le PER. Les résultats contradictoires obtenus nous ont incité à isoler certains microorganismes dégradant les HAP et présents dans le consortium afin de mieux étudier leurs actions dans des cultures biphasiques.



## **5.4 Étude de microorganismes isolés du consortium**

### **5.4.1 Leur isolement**

D'autres auteurs ont enrichi des consortia ou communautés microbiennes dégradant les HAP FPM (Tagger, Truffaut et Le Petit, 1990, Berardesco et al., 1998, Casellas et al., 1998) ou HPM (Mueller, Chapman et Pritchard, 1989, Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995, Juhasz, Britz et Stanley, 1997a, Guha, Peters et Jaffé, 1999, Boonchan, Britz et Stanley, 2000, Kanaly et al., 2000). La dégradation d'un mélange de HAP est un processus coopératif impliquant un ensemble de souches possédant des capacités de dégradation complémentaires (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1995a). Il est donc vraisemblable d'isoler des microorganismes possédant des voies métaboliques incomplètes ou diverses.

Lors du premier essai d'isolement, aucun microorganisme effectuant les premières étapes de dégradation des HAP testés n'a été isolé. Cela est probablement attribuable à l'âge du consortium au moment de l'isolement des microorganismes. Puisque le consortium était âgé de 21 jours, les populations dominantes risquaient d'être surtout constituées de microorganismes dégradant les métabolites des HAP. L'étude de ces microorganismes a été poursuivie même après un résultat négatif au test de vaporisation des HAP car, tel que discuté plus loin, certains microorganismes peuvent dégrader les HAP sans former de zone dans un film de HAP vaporisé. Constatant qu'aucun des microorganismes isolés ne dégradait les HAP en culture liquide (dans les conditions employées), une seconde procédure d'isolement fut entreprise.

Lors de la deuxième procédure d'isolement, l'échantillon provenait d'un enrichissement âgé de 12 jours et le test de vaporisation a été effectué très tôt. Afin de restreindre le nombre d'isolats étudiés, seules les colonies positives au test ont été retenues pour caractérisation subséquente. La croissance de microorganismes utilisant le NAP comme seule source de carbone assurait également des propriétés de dégradation des HAP.

La fréquence des repiquages, qui a été augmentée entre les présents travaux et ceux de Marcoux (1998), semble avoir eu un impact au niveau de l'isolement des souches. Le consortium étant toujours davantage enrichi en microorganismes dégradant le PYR et le CHY, il n'est pas surprenant de constater que la majorité des microorganismes isolés du consortium dégradent efficacement ces deux HAP (17/22), mais que presque aucun ne dégrade le BAP (5/22, aucun ne dégradant toute la quantité de BAP présente) et qu'aucun ne dégrade le PER. Ces résultats

pourraient toutefois aussi être explicables par le fait que les microorganismes ont été isolés d'un enrichissement âgé de 12 jours, dans lequel les microorganismes dégradant le BAP et le PER étaient présents en plus faible nombre.

Les différences entre les microorganismes isolés lors des première et seconde procédures d'isolement sont dues à la succession des populations au cours d'un enrichissement. Il y a en effet modification de la flore microbienne au cours d'un même repiquage. D'autres auteurs ont déjà observé une différenciation des populations microbiennes au cours d'une culture (Mueller et al., 1991, MacNaughton et al., 1999, Van Hamme, Odumeru et Ward, 2000, Kanaly et al., 2000). Selon ces derniers, les populations initialement présentes dans les cultures sont remplacées à mesure que les HAP sont oxydés par d'autres populations dégradant les métabolites et le matériel cellulaire relâché dû à la lyse.

Il est évident que les techniques d'isolement des microorganismes employées pour l'étude du consortium ont sous-évalué la diversité des microorganismes présents et n'ont permis d'en isoler qu'une certaine proportion (Jackson, Roden et Churchill, 1998). Cela est dû, entre autres, à la faible proportion de microorganismes capables de croître sur milieux solides. L'utilisation de deux approches d'isolement parallèles est conseillée pour isoler des microorganismes différents, ayant pour caractéristique commune la dégradation des HAP (Hedlund et al., 1999, Bastiaens et al., 2000). La dilution d'échantillons provenant du consortium est une approche qui favorisait l'isolement de microorganismes variés. Il n'est cependant pas certain que les microorganismes isolés soient dominants dans le consortium (Jackson, Roden et Churchill, 1998). La température de croissance, le milieu de culture et les HAP employés auraient aussi pu être variés pour isoler différents microorganismes.

Lors des procédures d'isolement des microorganismes, la maintenance des isolats pendant plusieurs semaines en culture ne contenant pas de HAP, et donc pas de pression sélective, peut avoir contribué à la perte du phénotype de dégradation chez certains isolats. Les gènes codant pour les voies de dégradation des HAP peuvent se trouver sur des plasmides, sur le chromosome ou sur les deux (Herrick et al., 1997). Kiyohara, Nagao et Yana (1982), Guerin et Jones (1988) et Kästner, Breuer-Jammali et Mahro (1994) ont rapporté des cas où la croissance d'une souche dans un milieu riche était corrélée avec une perte de plasmides et des capacités de dégradation des HAP. Ainsi, selon Mahro, Rode et Kasche (1995), la croissance des souches dans un milieu ne contenant pas de HAP favorise la sélection de microorganismes possédant un phénotype stable de

dégradation des HAP, ce qui constitue une méthode de sélection de microorganismes avantageuse. Dans le cas où les activités de dégradation sont conservées chez un isolat enrichi dans un milieu riche, il semble vraisemblable qu'une partie des voies de dégradation se trouvent sur le chromosome. La stabilité de la dégradation des HAP peut donc varier d'un microorganisme à l'autre, en fonction de l'emplacement génétique des voies de dégradation. Le transfert horizontal de matériel génétique, habituellement de gènes plasmidiques mais parfois aussi chromosomaux, peut contribuer à rétablir les phénotypes de dégradation perdus au fil des enrichissements sans pression sélective (Providenti, Lee et Trevors, 1993). Selon ces auteurs, la fréquence de transfert dépend de la taille et du ratio des cellules donneuses et receveuses. Le transfert horizontal de gènes peut aussi avoir contribué à la grande proportion de microorganismes dégradant les HAP dans le consortium ou aux larges activités de dégradation des HAP des microorganismes isolés (Zhou et Tiedje, 1995).

#### 5.4.2 Caractérisation des microorganismes

Parmi les microorganismes isolés, seulement 22/95 ont démontré de la dégradation des HAP. Les autres microorganismes isolés pouvaient être responsables de la dégradation de sous-produits des HAP, possédant une partie des voies métaboliques de dégradation, mais non la première étape. Il est aussi possible, que ces microorganismes n'aient eu aucun rôle à jouer dans la dégradation des HAP, mais qu'ils aient subsisté dans le consortium en utilisant la matière organique retrouvée dans l'extrait de sol.

Les 12 isolats ayant utilisé le NAP comme unique source de carbone pour leur croissance (voir tableau 2, section 4.3.1) ont, en général, démontré de moins bonnes capacités à dégrader les HAP HPM que les dix autres isolats décrits (voir tableau 3, section 4.3.1). Ces résultats obéissent à une tendance déjà observée voulant que les microorganismes possédant de bonnes capacités de dégradation des HAP FPM, en outre isolés grâce à cette caractéristique, soient moins efficaces à dégrader les HAP HPM, alors que les isolats dégradant efficacement les HAP HPM puissent aussi dégrader sans problème les HAP FPM (Kästner, Breuer-Jammali et Mahro, 1994). Tout comme ces auteurs, la majorité des isolats de notre étude possédaient de multiples phénotypes de dégradation, mais aucun n'a démontré de capacités de dégradation envers le PER. Parmi les isolats A1 à A12, tous dégradent le PHE (résultat similaire obtenu par Mueller et al. (1997), Carmichael et Pfaender (1997) et Aitken et al. (1998)), 8/12 dégradent le PYR, de ceux-ci 4/8 dégradent le CHY et de ces quatre, trois dégradent le BAP (effet entonnoir, les HAP plus complexes étant dégradés par un nombre de plus en plus restreint de microorganismes). La

dégradation du CHY et du BAP semble être corrélée avec une capacité élevée de dégradation du PHE, cet effet pouvant être dû à l'utilisation de voies métaboliques communes pour la dégradation de ces différents HAP chez certains isolats. L'hypothèse des voies communes de dégradation expliquerait que des microorganismes isolés à partir de leurs capacités de croissance sur du NAP puissent aussi dégrader des HAP HPM. D'autres microorganismes pourraient utiliser quant à eux des voies de dégradation distinctes pour chacun des HAP ou pour des HAP structurellement éloignés. Rappelons que les voies de dégradation des HAP ne sont pas toutes élucidées et qu'elles peuvent varier d'un microorganisme à l'autre pour un même HAP.

Les isolats du tableau 3 (voir section 4.3.1), quant à eux, dégradent tous le PHE, 9/10 dégradent le PYR et le CHY, alors qu'uniquement 2/10 dégradent le BAP. Il est intéressant de noter que, chez eux, les capacités de dégradation du PYR et du CHY semblent être reliées, impliquant possiblement des voies métaboliques communes. Selon Kästner, Breuer-Jammali et Mahro (1994), des microorganismes isolés selon la même procédure et en présence des mêmes HAP montrent souvent des spectres de dégradation similaires, même s'ils proviennent de sites éloignés. L'isolat B1, une mycobactérie, dégrade environ 19% du BAP présent, un résultat déjà obtenu par Grosser, Warshawsky et Vestal (1991) et Heitkamp, Franklin et Cerniglia (1988b) pour d'autres mycobactéries. La similarité de structure du PYR et du BAP suggère que leur dégradation soit effectuée par des voies enzymatiques similaires (Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991). Puisque le milieu dans lequel les essais de dégradation ont été effectués contenait de l'extrait de sol, il n'est pas possible d'affirmer que les isolats dégradent les HAP sans faire de cométabolisme. L'absence d'essais de minéralisation ne permet pas de conclure si les voies métaboliques présentes chez les différents isolats permettent une dégradation complète des HAP.

Les dix types de microorganismes isolés se sont avérés Gram positif la plupart du temps, tel qu'observé auparavant par Dean-Ross et Cerniglia (1996) et Kästner, Breuer-Jammali et Mahro (1994) (cette observation est contraire à celles de Mueller et al., 1997, de Aitken et al. (1998) et de Kanaly et al., 2000). Selon Mueller et al. (1997), la dominance des bactéries Gram positif pourrait être due à la procédure d'isolement. Les microorganismes isolés étaient oxydase positifs dans tous les cas. Shuttleworth et Cerniglia (1996), Samantha, Chakraborti et Jain (1999) et Hedlund et al. (1999) ont aussi remarqué que les souches dégradant les HAP qu'ils avaient isolées d'un sol (deux premiers cas) et d'origine marine (dernier cas) étaient toutes oxydase positives, sans qu'ils ne puissent expliquer ce résultat.

La température de croissance optimale des dix types microbiens était de 28 à 37°C, ce qui est commun pour des souches provenant de l'environnement (Kiyohara, Takizawa et Nagao, 1992). L'isolat B1, une mycobactérie, n'a pas pu croître à 4 ni à 42°C, un résultat préalablement obtenu par Heitkamp, Franklin et Cerniglia pour une autre mycobactérie (1988b). Des quatre isolats testés, seuls les isolats B1 et B44 ont pu croître sur milieu solide en utilisant le NAP comme unique source de carbone, indiquant que les isolats B21 et B51 étaient incapables d'utiliser le NAP présent sous forme de vapeurs. Selon les résultats obtenus à la section 4.3.3, les quatre isolats pouvaient croître en utilisant le NAP lorsque celui-ci était dissous dans la phase aqueuse ou la phase hydrophobe du système biphasique, indiquant que le NAP n'était pas toxique pour eux. Il est possible que le NAP ait été dégradé par cométabolisme dans le système biphasique par les isolats B21 et B51. Ces résultats sont contraires à ceux de Bouchez, Blanchet et Vandecasteele (1995a), qui avaient observé que le NAP fourni sous forme de vapeurs était toxique pour toute souche non isolée grâce à ce composé.

#### 5.4.3 Transformation de l'indole en indigo et test de vaporisation des HAP

Les résultats négatifs obtenus au test de l'indole, même pour les microorganismes dégradant les HAP, ne signifient pas nécessairement que les microorganismes isolés ne possédaient aucune enzyme de type dioxygénase, mais que ces enzymes n'ont pu être détectées par le test. D'autres auteurs ont déjà isolé des microorganismes capables de dégrader les HAP produisant une réponse négative au test de transformation de l'indole en indigo (Dagher et al., 1997, Ahn, Sanseverino et Sayler, 1999). Pour expliquer ce résultat, Dagher et al. (1997) avancent l'hypothèse que l'indole puisse ne pas pénétrer dans tous les types de microorganismes ou ne pas être un substrat pour les dioxygénases présentes dans certaines souches. Selon cette hypothèse, certains microorganismes pourraient posséder une dioxygénase légèrement modifiée dans son site actif, où les HAP pourraient encore se lier et être transformés, mais non l'indole. Sachant que ce dernier composé est transformé de façon fortuite par les dioxygénases (Carradeno et al., 2000), et que l'indole possède un cycle à cinq carbones alors que les HAP sont constitués de cycles à six carbones, la possibilité d'une modification du site actif de l'enzyme, sans conséquence pour la dégradation des HAP mais abolissant l'activité envers l'indole, semble plausible. Enfin, la possibilité demeure que de nouvelles enzymes, différentes des dioxygénases déjà connues et ne catalysant pas la transformation de l'indole, soient impliquées dans la transformation des HAP.

Le test de vaporisation des HAP n'a pas montré une corrélation de 100% entre les activités de dégradation des isolats et leur formation de halos dans le film de HAP vaporisé. Pour le PHE, 9

isolats sur dix ont montré la formation de halo, mais cette proportion n'a atteint que quatre isolats sur dix pour le PYR. La formation d'un pigment brun stable a été observée dans certains cas lors de la vaporisation par le PYR, un résultat auparavant observé par Dagher et al. (1997), de même que par Ho et al. (2000) (dans ce cas, le pigment était brun-vert). Selon Dagher et al., l'accumulation d'intermédiaires de dégradation non dégradables du PYR serait responsable de la coloration brune adoptée par les colonies. Cette coloration brune a été observée chez un nombre limité d'isolats microbiens étudiés. Cela suggère que ceux-ci ne possèdent que les premières étapes de la voie de dégradation, menant à une impasse métabolique et à l'accumulation du composé coloré, et que les dix isolats ne possèdent pas tous la même voie métabolique. Ho et al. (2000) affirment quant à eux que la formation de produits colorés indique que du cométabolisme est survenu.

Nous avons isolé des microorganismes capables de dégrader des HAP, mais ne formant pas de zone dans le film de HAP vaporisé. Cela peut être expliqué lorsque l'isolat requiert un autre substrat pour la dégradation du HAP, soit pour induire les enzymes responsables de la dégradation, soit parce que le composé est dégradé par cométabolisme. De plus, certains microorganismes sont peut-être incapables de dégrader les HAP sous forme cristalline. Enfin, lorsque l'isolat testé avait une croissance rapide, il est possible que l'expansion de la colonie ait couvert le halo formé dans le film de HAP, ce dernier apparaissant très rapidement dans le cas du PHE (< 24 heures), mais lentement dans le cas du PYR (5 à 7 jours). Il est à noter que la formation de halo ne signifie pas que l'organisme peut minéraliser le HAP, mais qu'il est seulement capable de débiter sa dégradation (Dagher et al., 1997). Les résultats négatifs obtenus lors des tests de vaporisation par le FLU, le CHY et le BAP s'expliquent par le fait que les microorganismes n'ont pas été enrichis en présence de FLU (et qu'ils ne possèdent donc vraisemblablement pas de capacité de dégradation envers ce HAP) et que les HAP CHY et BAP se prêtent mal à la vaporisation. Ceux-ci forment en effet un film très épais et des halos dans ces films ont rarement été observés, y compris par des microorganismes capables de les dégrader en culture liquide (Ahn, Sanseverino et Sayler, 1999). Ho et al. (2000) sont les seuls auteurs à avoir obtenu des halos dans des films de CHY et de BAP. Ils ont aussi observé des halos dans des films d'autres HAP, sans que les microorganismes ne dégradent nécessairement ceux-ci en culture liquide. Ces auteurs ont utilisé un milieu solide riche afin de fournir des sources d'énergie aidant les microorganismes à former le halo, cette méthode ayant l'avantage de permettre aussi la détection de microorganismes faisant du cométabolisme. Malgré que le test de vaporisation des

HAP ne permet pas une corrélation de 100% avec les activités de dégradation des microorganismes, cette méthode de criblage s'avère rapide et efficace.

#### 5.4.4 Caractérisation des isolats B1, B21, B44 et B51

Parmi tous les isolats obtenus, quatre ont été identifiés. Ils s'apparentent à *Mycobacterium gilvum* (isolat B1), *Microbacterium esteraromaticum* (isolat B21) et au genre *Porphyrobacter* (isolats B44 et B51). De nombreux auteurs ont décrit auparavant les capacités de dégradation des HAP par les mycobactéries (Heitkamp, Franklin et Cerniglia, 1988b, Guerin et Jones, 1988, Grosser, Warshawsky et Vestal, 1991, Boldrin, Tiehm et Fritzsche, 1993, Dean-Ross et Cerniglia, 1996, Tongpim et Pickard, 1996, 1999, Berardesco et al., 1998, Churchill, Harper et Churchill, 1999, Molina, Araujo et Hodson, 1999, Ho et al., 2000, Kanaly et al., 2000, Bastiaens et al., 2000). Ces derniers auteurs ont isolé deux souches de *Mycobacterium* très parentes avec *Mycobacterium gilvum*. Marcoux (1998) avait par ailleurs déjà observé la présence de *Mycobacterium gilvum* dans le consortium microbien qu'il étudiait et duquel ont été isolés les microorganismes décrits. Cela démontre que cette espèce s'est maintenue dans le consortium au fil du temps. Benachenhou avait quant à lui étudié certaines caractéristiques de cette souche de *Mycobacterium gilvum* dans son étude de 1998. Kästner, Breuer-Jammali et Mahro (1994) affirment que les Nocardioformes (dont font partie les mycobactéries) représentent une grande partie de la microflore du sol capable de dégrader les HAP. Selon Mueller et al. (1997), les capacités de dégradation des HAP tendent à être associées avec un nombre limité de genres microbiens, indépendamment du sol dont provient l'isolat. Kelley et al. (1993) et Dean-Ross et Cerniglia (1996) ont proposé une voie de dégradation du FLA et du PYR, respectivement, par une mycobactérie, qui pourrait aussi être utilisées par l'isolat B1. L'isolat *Microbacterium esteraromaticum* (B21), auparavant classé *Aureobacterium esteraromaticum* ou encore *Flavobacterium esteraromaticum*, n'a jamais été impliqué dans la dégradation de HAP et, à notre connaissance, aucun membre du genre *Porphyrobacter* (isolats B44 et B51) n'y a été associé non plus.

Les performances de dégradation des HAP par les isolats B1, B21, B44 et B51 dans différents milieux révèlent que les isolats possèdent des capacités métaboliques variant de l'un à l'autre. En effet, si le milieu BH avec extrait de sol s'avère le milieu permettant les meilleures performances de dégradation dans trois cas sur quatre, étant le milieu d'isolement, les isolats ont des performances de dégradation qui diffèrent dans les autres milieux testés. Les isolats B1 et B51 ont démontré moins de dégradation des HAP dans les milieux riches, possiblement parce que ceux-ci inhibent la dégradation des HAP, soit au niveau génétique (Guerin et Jones, 1988) ou simplement

parce qu'ils contiennent des nutriments facilement disponibles pour les microorganismes (Keuth et Rehm, 1991). L'isolat B44, au contraire, a montré plus de dégradation dans les milieux riches, peut-être parce qu'il effectue la dégradation des HAP par cométabolisme avec des composés présents dans les milieux riches, plus rares (ou absents) dans les milieux pauvres. Les milieux riches lui permettent peut-être aussi une croissance plus abondante et donc une dégradation plus extensive (Cullen, Li et Reimer, 1994). Quant à l'isolat B21, aucune tendance particulière concernant ses performances de dégradation dans différents milieux ne peut être déduite.

La dégradation du PYR et du CHY est survenue de façon simultanée chez les isolats B1 et B44, indiquant des capacités métaboliques ne requérant pas la consommation d'un HAP avant l'autre et peut-être la présence de voies métaboliques différentes pour ces deux HAP. Kelley et Cerniglia (1995) ont observé un résultat semblable pour leur mycobactérie. Chen et Aitken (1999), Juhasz, Stanley et Britz (2000), Molina, Araujo et Hodson (1999) et McNally, Mihelcic et Lueking (1999) ont aussi déjà observé une dégradation simultanée des HAP par des microorganismes en culture pure. La dégradation séquentielle du PYR et du CHY chez les isolats B21 et B51 indique qu'ils sont vraisemblablement dégradés par la même voie métabolique, du moins lors des premières étapes (Kelley et Cerniglia, 1995). Cette voie diffère toutefois entre les deux isolats puisque le CHY est dégradé avant le PYR par l'isolat B21, mais que le PYR l'est avant le CHY par l'isolat B51. En travaillant avec un consortium, Benachenhou (1998) avait lui aussi observé la disparition séquentielle du CHY après le PYR.

La dégradation du BAP par l'isolat B1 a augmenté lorsque ce HAP faisait partie d'un mélange de HAP HPM. Une étude subséquente a révélé que l'effet stimulateur était principalement dû au PYR (voir figure 14 A, section 4.3.4). Le PYR et le BAP ont une similarité de structure (voir annexe 1), laissant supposer une possible induction de la dégradation du BAP par le PYR. Selon Juhasz, Britz et Stanley (1997a), il est possible que le PYR, ou des métabolites produits durant sa dégradation, induise la synthèse d'enzymes nécessaires pour la dégradation du BAP. Ces enzymes pourraient demeurer non induites ou nécessiter une longue période d'induction lorsque les microorganismes sont exposés au BAP sans autre HAP. Cependant, une fois la dégradation du BAP amorcée, les produits de dégradation du BAP pourraient maintenir la synthèse d'enzymes inductibles. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée dans nos expériences car la présence du PYR était continue dans les cultures. De plus, il n'a pas été démontré si le BAP était dégradé en présence de PYR grâce à l'induction des voies métaboliques ou par cométabolisme. Le NAP et le PHE n'ont pas eu d'effet sur la dégradation du BAP (voir figure 10 E, section 4.3.3),



probablement parce que ces HAP ne sont pas des inducteurs de la dégradation du BAP chez l'isolat B1 ou qu'ils n'étaient pas des cosubstrats appropriés. Mentionnons que Juhasz, Britz et Stanley (2000) ont isolé un consortium dégradant le BAP par cométabolisme avec le PYR, de même qu'une souche de *Stenotrophomonas maltophilia* possédant les mêmes capacités.

Chez l'isolat B51, la dégradation du BAP a aussi été favorisée lorsque ce dernier faisait partie d'un mélange de HAP HPM. Le CHY semble être le HAP responsable de cet effet (voir figure 14 B, section 4.3.4), ces deux HAP étant eux aussi structurellement parents (voir annexe 1). Lorsque le PYR était présent avec le CHY, la dégradation du BAP a été légèrement plus faible. Ceci laisse supposer un effet de compétition du CHY et du PYR pour les voies métaboliques, dans le cas où la dégradation du BAP aurait lieu par cométabolisme avec le CHY ou ses métabolites de dégradation. La réduction de la dégradation du BAP pourrait aussi être due à une inhibition causée par le PYR ou ses métabolites, comme cela a déjà été rapporté par Kazunga et Aitken (2000). Comme pour l'isolat B1, le NAP et le PHE n'ont pas favorisé la dégradation du BAP (voir figure 11 E, section 4.3.3). La dégradation du BAP par cométabolisme avec d'autres HAP a déjà été rapportée dans la littérature (Juhasz, Britz et Stanley, 1997b), y compris avec des HAP HPM (Kanaly et al., 2000). Ajoutons enfin que le BBF s'est déjà montré responsable de la stimulation de la dégradation du BAP (Ye et al., 1996).

Pour les isolats B21 et B44, la présence de NAP a nui à la dégradation du PYR et du CHY, lorsque ces deux derniers faisaient partie d'un mélange de HAP HPM (voir figures 12 C et D et 13 C et D, section 4.3.3). Ces phénomènes négatifs pourraient être attribués à une inhibition des voies métaboliques par le NAP, à une préférence des microorganismes pour le NAP (vs les autres HAP) parce qu'il est plus facilement dégradé ou à une inhibition compétitive pour le système de transport des HAP à l'intérieur des cellules ou pour l'enzyme effectuant la première étape de la dégradation.

#### 5.4.5 Étude de la localisation des isolats B1, B21, B44 et B51 dans le système biphasique

La présence d'un biofilm à l'interface des phases aqueuse et hydrophobe du système biphasique a été observée à plusieurs reprises au cours des présentes expériences, ainsi que dans de nombreuses autres (Efroymson et Alexander, 1991, Ortega-Calvo et Alexander, 1994, Ascon-Cabrera et Lebeault, 1995b, Osswald, Baveye et Block, 1996, Jimenez et Bartha, 1996). Le biofilm est dû à l'adhésion de microorganismes à la phase hydrophobe, ces derniers consommant possiblement les HAP directement à partir de celle-ci et étant vraisemblablement davantage

hydrophobes que ceux en suspension dans la phase aqueuse. La formation de biofilm n'a pas été étudiée (mais a été observée) dans les expériences où tout le consortium était présent car il était alors difficile de déterminer quels microorganismes composaient le biofilm, si ceux-ci étaient une sous-population distincte parmi tous les microorganismes présents ou s'ils étaient davantage adaptés à la phase hydrophobe et/ou au polluant. Une étude a par contre eu lieu avec quatre isolats.

Dans cette étude, si l'on compare les résultats observés pour les isolats B1 et B51 (voir figures 10 et 11, section 4.3.3), on observe que ce dernier a davantage adhéré à la phase hydrophobe dans les cultures contenant du NAP et du PHE. En effet, la concentration de protéines mesurée à l'interface des deux phases liquides était 8 et 3 fois plus importante pour l'isolat B51 après 39 jours dans les cultures contenant du NAP et du PHE, respectivement, que pour l'isolat B1. Le NAP et le PHE étaient présents en très forte quantité dans l'huile de silicone, mais aussi dans la phase aqueuse, avoisinant vraisemblablement leur solubilité maximale dans cette phase. Les deux isolats ayant eu des comportements d'adhésion à l'huile de silicone différents, cela peut signifier qu'ils ont une stratégie différente d'accession aux HAP, l'isolat B1 effectuant préférentiellement la dégradation des HAP sous forme dissoute dans la phase aqueuse et l'isolat B51, sous forme dissoute dans la phase hydrophobe (Bouchez, Blanchet et Vandecasteele, 1997). Les résultats d'adhésion peuvent aussi signifier que l'isolat B51 est plus hydrophobe que l'isolat B1, dans les conditions de culture employées (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993, Osswald, Baveye et Block, 1996). Les cultures contenant du BAP comme unique HAP ou un mélange de HAP HPM ont connu davantage de croissance dans la phase aqueuse qu'à l'interface, signifiant que la dégradation a été effectuée principalement dans la phase aqueuse, où les HAP étaient présents en faible quantité. Ces cultures ont connu moins de croissance que les deux autres types de cultures car elles contenaient des HAP moins faciles à dégrader et en moindre quantité. Puisque les figures 10 E et 11 E révèlent que la dégradation du BAP n'a eu lieu que dans les cultures contenant le mélange de HAP HPM (et à un faible niveau), cela implique que la croissance observée dans les autres cultures a eu principalement lieu aux dépens du NAP, du PHE et de l'extrait de sol.

En ce qui concerne le déplacement des microorganismes entre les deux phases liquides des cultures dans le temps, l'isolat B1 s'est possiblement déplacé de la phase aqueuse vers l'interface entre les temps 24 et 39 jours dans les cultures contenant du BAP uniquement (une marge d'erreur importante a cependant été obtenue lors de la quantification des protéines cellulaires dans la phase aqueuse). Ce phénomène pourrait s'expliquer en supposant que la phase aqueuse

était à ce moment réduite en nutriments et que les microorganismes aient adhéré à la phase hydrophobe car celle-ci contenait davantage de nutriments. Cependant, Efroymson et Alexander (1991) et Rosenberg (1991) ont rapporté que des cellules pouvaient adhérer à une phase hydrophobe par simple hydrophobicité de surface et non par recherche de nutriments. Selon Jimenez et Bartha (1996), l'attachement des cellules à la phase hydrophobe est un processus lent, graduel, qui peut refléter les changements d'hydrophobicité de surface lié au vieillissement de la culture, ce qui explique l'augmentation d'hydrophobicité progressive des cultures au fil du temps pour les quatre isolats. Dans les cultures contenant du NAP, l'isolat B1 a démontré une diminution de la quantité de protéines présentes dans la phase aqueuse au temps 39 jours. Cela pourrait être dû à une trop grande accumulation de métabolites de dégradation du NAP, rendant le milieu toxique pour les microorganismes. En effet, il n'y a pas de déplacement des cellules vers la phase hydrophobe, mais plutôt une disparition des cellules, correspondant probablement à leur lyse (Collins et Daugulis, 1997). Pour l'isolat B51, dans les cultures contenant du NAP, on observe la même disparition des cellules de la phase aqueuse entre les temps 24 et 39 jours que pour l'isolat B1, à la différence que la concentration de protéines dosées à l'interface des phases a augmenté d'environ 50 µg/mL et que cela correspond à la diminution observée dans la phase aqueuse. Cette observation suggère donc un déplacement des cellules. Si cette hypothèse est vraie, elle met en évidence une plus grande résistance de l'isolat B51 aux métabolites toxiques du NAP (en comparaison avec l'isolat B1). Dans les cultures contenant du BAP sans autre HAP, on observe le même phénomène que pour l'isolat B1, c'est-à-dire un déplacement des microorganismes de la phase aqueuse vers l'interface, possiblement dû à un manque de nutriments ou à une plus grande hydrophobicité des cellules.

Puisque la séparation des phases des cultures impliquait une centrifugation, il est possible, selon Jimenez et Bartha (1996), que des cellules attachées moins fortement à la phase hydrophobe se soient détachées et, donc, que la concentration de protéines mesurée soit inférieure à la concentration réelle. Joannis, Delia et Riba (1998) soutiennent par contre que le pourcentage de protéines est très élevé dans un biofilm et attribuent ce phénomène à un changement du métabolisme bactérien ou à une accumulation de protéines dans les polymères extracellulaires du biofilm.

Dans le cas des isolats B21 et B44, les résultats de quantification de protéines sont comparables (voir figures 12 et 13, section 4.3.3). Une proportion beaucoup plus forte de protéines était observée dans la phase aqueuse des cultures contenant du NAP, signifiant que les

microorganismes dégradent ce HAP sous forme dissoute dans la phase aqueuse. Il est intéressant de noter que la croissance en utilisant le NAP, dans les conditions employées, a été réalisée par chacun des quatre isolats, même si uniquement les isolats B1 et B44 avaient démontré des capacités de croissance sur milieu solide lorsque le NAP était l'unique source de carbone présente (voir tableau 5, section 4.3.2). Les isolats B21 et B44 n'ont pas effectué de dégradation du PYR ni du CHY lorsque le NAP était présent, soit parce que leurs voies métaboliques étaient engorgées par la présence d'autant de NAP, soit parce qu'ils n'étaient que peu adsorbés à l'huile de silicone et que la solubilité des HAP dans l'eau était trop faible pour permettre une croissance et une dégradation observable. Dans les cultures où le NAP était absent, des concentrations égales de protéines ont été mesurées à l'interface et dans la phase aqueuse, appuyant l'hypothèse que l'adhésion des microorganismes facilite la dégradation du PYR et du CHY.

Il a été démontré que les microorganismes adhérant à la phase hydrophobe d'un système biphasique pouvaient posséder des capacités de dégradation beaucoup plus importantes que ceux de la phase aqueuse, métabolisant les composés jusqu'à 8,5 fois plus rapidement qu'eux (Jimenez et Bartha, 1996). Cela laisse croire que des cultures possédant plus de microorganismes à l'interface risquent de démontrer des meilleurs rendements de dégradation (mais cela ne fut pas quantifié au cours des présentes études). Il est à noter que, pour les quatre isolats testés, l'on aurait pu s'attendre à observer une adhésion des microorganismes à l'huile de silicone au début de l'expérience, puis un déplacement par la suite dans la phase aqueuse car celle-ci aurait alors contenu des sous-produits de dégradation des HAP, permettant la croissance et la survie des microorganismes. Cette tendance ne s'est cependant pas produite. La localisation des cellules dans le système biphasique est donc un paramètre qui peut varier pour un même isolat en fonction des HAP présents.

**6**  
***Conclusion***

Les HAP HPM sont des molécules particulièrement persistantes dans l'environnement et cela est principalement dû à leur très faible biodisponibilité. L'utilisation d'un bioréacteur de type biphasique permet de contrer cette tendance en solubilisant les HAP dans une phase liquide hydrophobe non biodégradable. Utilisant cette nouvelle approche, Marcoux (1998) a obtenu, après enrichissement, un consortium microbien ayant la capacité de dégrader un mélange de cinq HAP, dont des HAP HPM.

Le premier objectif de ce projet consistait à optimiser certains paramètres du système biphasique développé auparavant (Marcoux, 1998), afin d'améliorer les cinétiques de dégradation des HAP par le consortium. Les essais ont démontré que la proportion de la phase hydrophobe présente dans le système biphasique n'influait pas de façon marquée les cinétiques de dégradation. Une légère augmentation de la dégradation a été obtenue avec 10% d'huile de silicone, comparativement à 30% et 40%. La proportion de 20% de phase hydrophobe utilisée dans les travaux de Marcoux a cependant été conservée lors des essais subséquents.

Les essais où des mélanges de HAP étaient utilisés, comprenant un HAP FPM (NAP ou PHE) ayant pour but de stimuler la dégradation des autres HAP présents, ont montré des effets mitigés sur la dégradation des HAP HPM étudiés. En effet, le NAP a démontré un effet positif sur la dégradation du CHY, du BAP et possiblement du PER, ainsi qu'un effet négatif sur la dégradation du PYR. Le PHE a quant à lui démontré un effet positif sur la dégradation du BAP, l'effet étant proportionnel à la dose de PHE, et un effet négatif sur la dégradation du PYR. En général, les effets positifs observés peuvent être attribués à des phénomènes d'induction des voies métaboliques, de cométabolisme ou d'accroissement de la population de microorganismes dégradant les HAP. Les phénomènes négatifs observés sur la dégradation peuvent quant à eux être dus au métabolisme exclusif du HAP FPM, à l'inhibition de la voie métabolique par le HAP FPM, à l'accumulation de métabolites toxiques dans le milieu (provenant de la dégradation d'une quantité abondante de HAP FPM), de même qu'à des phénomènes d'inhibition compétitive pour le système de transport des HAP à l'intérieur des cellules ou pour l'enzyme effectuant la première étape de dégradation de la voie.

Le second objectif de cette étude consistait à isoler des microorganismes composant le consortium et ayant la capacité de dégrader des HAP. L'évolution du consortium au fil des repiquages nous a amené à restreindre notre étude à un nombre limité de microorganismes, de façon à pouvoir déduire plus clairement des informations sur le comportement de ceux-ci. La

diversité des microorganismes obtenus au cours des deux procédures d'isolement nous incite à croire qu'un très grand nombre de microorganismes sont présents dans le consortium étudié et impliqués à différents niveaux dans la dégradation d'un mélange de HAP HPM. La variété des isolats obtenus lors des deux procédures d'isolement est vraisemblablement due à la succession des populations dominantes au cours d'un enrichissement, les échantillons prélevés provenant de cultures d'enrichissements dont l'âge différait. Parmi les microorganismes isolés, 73 types morphologiques différents se sont montrés incapables d'effectuer la première étape de la dégradation des HAP étudiés. Ces isolats pourraient être impliqués dans la dégradation de métabolites intermédiaires des voies cataboliques des HAP, générés par d'autres microorganismes. Il peut aussi s'agir de microorganismes subsistant dans le consortium grâce à la matière organique retrouvée dans l'extrait de sol.

L'isolement de douze types morphologiques différents lorsque le NAP sous forme de vapeurs était l'unique source de carbone disponible ainsi que de dix autres types obtenus sur trois milieux gélosés et dégradant les HAP démontre que différentes techniques d'isolement peuvent mener à l'obtention de microorganismes différents provenant de la même source. Il importe de préciser que seuls les microorganismes capables de croissance sur milieu solide ont pu être isolés par les procédures d'isolement employées. Sachant qu'uniquement une fraction des microorganismes peut croître sur milieu solide, le consortium renfermait vraisemblablement un nombre beaucoup plus élevé de microorganismes que ceux isolés.

Le troisième objectif du projet consistait à caractériser un certain nombre des microorganismes isolés. Quatre isolats ont ainsi été étudiés, dont deux appartenant au genre *Porphyrobacter*, un genre n'ayant jamais été impliqué dans la dégradation des HAP auparavant. Les deux autres isolats s'apparentaient à *Microbacterium esteraromaticum* et à *Mycobacterium gilvum*, une espèce précédemment isolée du consortium par Marcoux (1998). Les mycobactéries ont en outre été fréquemment rapportées comme dégradant les HAP dans la littérature.

Les quatre isolats ont démontré des phénotypes de dégradation de multiples HAP, mais aucun n'a pu dégrader le PER. L'absence d'essais de minéralisation empêche de connaître si les voies métaboliques présentes chez les différents isolats étaient complètes ou non. Les isolats n'ont pas produit de biosurfactants dans les différentes conditions de culture testées. Leur comportement de croissance et de dégradation des HAP dans les quatre milieux de croissance employés a différencié l'un à l'autre, ce qui démontre que ces isolats possèdent sans aucun doute des voies différentes de

dégradation des HAP ou des mécanismes de régulation ou de transport différents. La séquence dans laquelle les HAP ont été dégradés était propre à chaque isolat et appuie aussi l'hypothèse précédente, tout comme l'effet de stimulation de la dégradation du BAP observé lors de la présence de PYR (isolat B1) et de CHY (isolat B51). Cet effet positif pourrait être dû à l'induction des voies métaboliques ou à des phénomènes de cométabolisme. Peu d'auteurs ont rapporté la stimulation de la dégradation d'un HAP HPM par un autre HAP HPM.

La localisation de la biomasse dans le système biphasique a permis de démontrer que les isolats étudiés possédaient des comportements différents d'adhésion à la phase hydrophobe, pouvant révéler des degrés d'hydrophobicité de surface variables. La localisation des cellules en biofilm à l'interface des deux phases liquides suggère que ces cellules acquièrent les HAP directement de la phase hydrophobe plutôt que dissous dans la phase aqueuse (stratégie d'accession aux HAP différente de celle des cellules présentes dans la phase aqueuse). Le déplacement des cellules entre la phase aqueuse et l'interface était graduel mais constant dans le temps et ce, pour tous les types de cultures réalisés. La proportion des cellules localisées dans la phase aqueuse par rapport à celles localisées à l'interface des deux phases liquides s'est avérée variable d'un isolat à l'autre ainsi que pour un même isolat, selon les sources de carbone présentes.

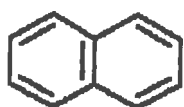
Afin de compléter les essais réalisés dans le cadre de cette étude, des expériences supplémentaires devraient être effectuées. Elles pourraient inclure des essais de minéralisation des HAP par les isolats effectuant la première étape de la dégradation, afin de déterminer si ceux-ci possèdent les voies métaboliques complètes de dégradation d'un ou de plusieurs HAP. Une attention particulière devrait aussi être portée aux intermédiaires générés au cours du métabolisme. De même, il serait intéressant de coupler plusieurs isolats possédant des voies de dégradation incomplètes d'un HAP, de façon à pouvoir reconstituer la totalité de la voie. Une telle expérience permettrait d'éclaircir les relations survenant entre des isolats interdépendants et d'étudier leur localisation dans le système biphasique (à l'interface et/ou dans la phase aqueuse). Finalement, il serait pertinent de tester le consortium dans un système biphasique contenant un sol ou un effluent contaminé par les HAP, dans le but de déterminer l'efficacité réelle du système.

Les résultats obtenus lors de cette étude révèlent qu'un consortium de microorganismes, et même des isolats individuels, peuvent parvenir à la dégradation d'un mélange de HAP HPM dans un système biphasique. Ces résultats démontrent qu'il est donc possible de dégrader de façon biologique des composés très hydrophobes, auparavant qualifiés de non biodégradables.

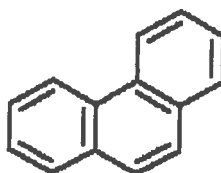


L'utilisation d'un système biphasique pourrait vraisemblablement permettre la biodégradation d'autres composés hydrophobes ou toxiques, rendant plus efficace les procédés de biorestauration, et devenir une méthode de dépollution de choix, applicable à de nombreux polluants.

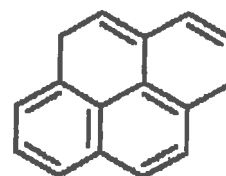
## *Annexes*

*Annexe 1*

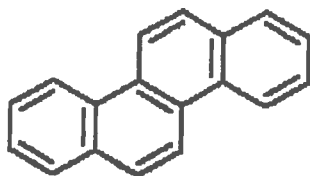
Naphtalène



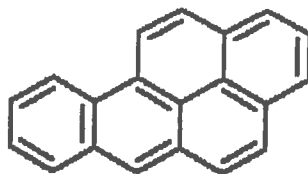
Phénanthrène



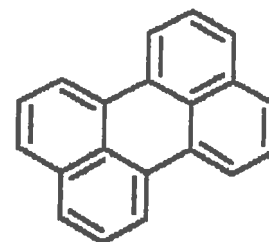
Pyrène



Chrysène

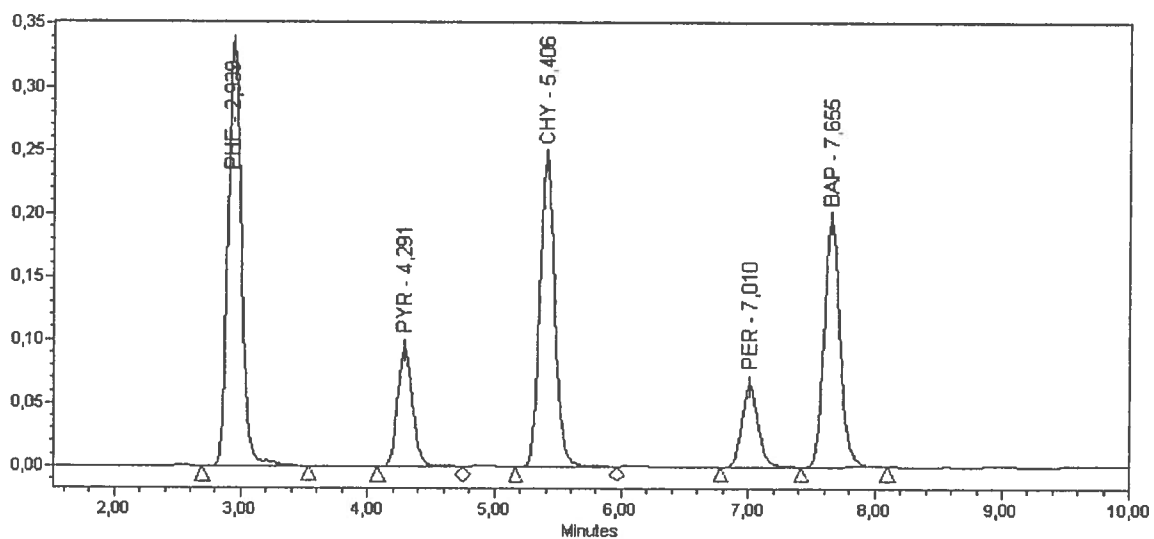


Benzo[a]pyrène



Pérylène

**Structure des six HAP utilisés dans cette étude.**

*Annexe 2*

**Exemple de chromatogramme, obtenu par l'analyse au HPLC des HAP après extraction de l'huile de silicone. Les analyses ont été effectuées à une longueur d'onde de 254 nm. Le nom de chaque HAP est indiqué au-dessus de chacun des pics chromatographiques. La quantité de chaque HAP est proportionnelle à l'aire sous la courbe (axe ordonnée en volts).**

*Annexe 3***Solubilité des cristaux de HAP dans l'eau.**

	Solubilité dans l'eau (mg/L) <sup>1</sup>
NAP	32,0
PHE	1,0
PYR	0,160
CHY	0,0060
BAP	0,0038
PER	0,0040

<sup>1</sup>Solubilité à 25°C

## *Liste des références*

- Abe A., A. Inoue, R. Usami, K. Moriya et K. Horikoshi. 1995. « Degradation of polyaromatic hydrocarbons by organic solvent-tolerant bacteria from deep sea ». Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, vol. 59. p. 1154-1156.
- Ahn Y., J. Sanseverino et G. S. Saylor. 1999. « Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils ». Biodegradation, vol. 10. p. 149-157.
- Aislabie J., M. McLeod et R. Fraser. 1998. « Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 49. p. 210-214.
- Aitken M. D., S.-H. Chen, C. Kazunga et R. B. Marx. 1997. « Bacterial biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons ». [www.sph.unc.edu/envr/esenotes/spr97/aitken.htm](http://www.sph.unc.edu/envr/esenotes/spr97/aitken.htm)
- 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 ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 44. p. 743-752.
- Annweiler E., H. H. Richnow, G. Antranikian, S. Hebenbrock, C. Garms, S. Franke, W. Francke et W. Michaelis. 2000. « Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans* ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 518-523.
- April T. M., J. M. Foght et R. S. Currah. 2000. « Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 46. p. 38-49.
- Ascon-Cabrera M. et J.-M. Lebeault. 1993. « Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 1717-1724.
- Ascon-Cabrera M. et J.-M. Lebeault. 1995a. « Interfacial area effects of a biphasic aqueous/organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 43. p. 1136-1141.
- Ascon-Cabrera M. et J.-M. Lebeault. 1995b. « Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system ». Journal of Fermentation Technology, vol. 80. p. 270-275.
- Atlas R. M. 1977. « Stimulated petroleum degradation ». Critical Reviews in Microbiology, vol. 5. p. 371-386.
- Atlas R. M. et C. E. Cerniglia. 1995. « Bioremediation of petroleum pollutants : Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation ». BioScience, vol. 45. p. 332-338.
- Barclay C. D., G. F. Farquhar et R. L. Legge. 1995. « Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium* ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 42. p. 958-963.

- Barkay T., S. Navon-Venezia, E. Z. Ron et E. Rosenberg. 1999. « Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 2697-2702.
- Barnsley E.A. 1975. « The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 21. p. 1004-1008.
- Barriault D., J. Durand, H. Maaroufi, L. D. Eltis et M. Sylvestre. 1998. « Degradation of polychlorinated biphenyl metabolites by naphthalene-catabolizing enzymes ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 4637-4642.
- Barriault D. et M. Sylvestre. 1999. « Functionality of biphenyl 2,3-dioxygenase components in naphthalene 1,2-dioxygenase ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51. p. 592-597.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 1834-1843.
- Bateman B. N., B. Speer, L. Feduik et R. A. Hartline. 1986. « Naphthalene association and uptake in *Pseudomonas putida* ». Journal of Bacteriology, vol. 166. p. 155-161.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 1649-1655.
- Benachenhou A. 1998. « Effet de l'ajout d'une phase hydrophobe sur la biodégradation des HAP dans un réacteur à boues liquides ». Mémoire de maîtrise, Montréal, École Polytechnique de Montréal, 125 p.
- Berardesco G., S. Dyrhman, E. Gallagher et M. Shiaris. 1998. « Spatial and temporal variation of phenanthrene-degrading bacteria in intertidal sediments ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 2560-2565.
- Bogan B. W. et R. T. Lamar. 1996. « Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and its extracellular ligninolytic enzymes ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 1597-1603.
- Boldrin B., A. Tiehm et C. Fritzsche. 1993. « Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 1927-1930.
- Boonchan S., M. L. Britz et G. A. Stanley. 1998. « Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* ». Biotechnology and Bioengineering, vol. 59. p. 482-494.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 1007-1019.



Bossert I. D. et R. Bartha. 1986. « Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil ». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 37. p. 490-495.

Bouchez M., D. Blanchet et J.-P. Vandecasteele. 1995a. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations : inhibition phenomena and cometabolism ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 43. p. 156-164.

Bouchez M., D. Blanchet, B. Besnainou et J.-P. Vandecasteele. 1995b. « Diversity of metabolic capacities among strains degrading polycyclic aromatic hydrocarbons ». In *Microbial Processes for Bioremediation*. Edited by Hinchee R. E., C. M. Vogel and F. J. Brockman : Battelle Press, Columbus. p. 153-159.

Bouchez M., D. Blanchet et J.-P. Vandecasteele. 1995c. « Substrate availability in phenanthrene biodegradation : transfer mechanism and influence on metabolism ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 43. p. 952-960.

Bouchez M., D. Blanchet, F. Haeseler et J.-P. Vandecasteele. 1996a. « Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : propriétés, origines, devenir ». Revue de l'Institut Français du Pétrole, vol. 51. p. 407-419.

Bouchez M., D. Blanchet, F. Haeseler et J.-P. Vandecasteele. 1996b. « Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : la dégradation par voie microbienne ». Revue de l'Institut Français du Pétrole, vol. 51. p. 797-828.

Bouchez M., D. Blanchet et J.-P. Vandecasteele. 1997. « An interfacial uptake mechanism for the degradation of pyrene by a *Rhodococcus* strain ». Microbiology, vol. 143. p. 1087-1093.

Bouchez-Naïtali M., H. Rakatozafy, R. Marchal, J.-Y. Leveau et J.-P. Vandecasteele. 1999. « Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake ». Journal of Applied Microbiology, vol. 86. p. 421-428.

Caldini G., G. Cenci, R. Manenti et G. Morozzi. 1995. « The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 44. p. 225-229.

Carman K. R., J. W. Fleeger, J. C. Means, S. M. Pomarico et D. J. McMillin. 1995. « Experimental investigation of the effects of polynuclear aromatic hydrocarbons on an estuarine sediment food web ». Marine Environmental Research, vol. 40. p. 289-318.

Carmichael L. M. et F. K. Pfaender. 1997. « Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils : relationship to soil characteristics and preexposure ». Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 16. p. 666-675.

Carredano E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury, R. E. Parales, J. V. Parales, K. Lee, D. T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy. 2000. « Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase : functional implications of indole binding ». Journal of Molecular Biology, vol. 296. p. 701-712.

- Casellas M., M. Grifoll, J. Sabaté et A. M. Solanas. 1998. « Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 44. p. 734-742.
- Cerniglia C. E., D. T. Gibson et C. Van Baalen. 1980. « Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae ». Journal of General Microbiology, vol. 116. p 495-500.
- Cerniglia C. E. et M. A. Heitkamp. 1989. « Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment ». In Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. Edited by Varanasi U. Boca Raton : CRC Press. p. 41-68.
- Cerniglia C. E. 1992. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons ». Biodegradation, vol. 3. p. 351-368.
- Cerniglia C. E. 1993. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons ». Current Opinion in Biotechnology, vol. 4. p. 331-338.
- Chaineau C. H., J. L. Morel et J. Oudot. 1995. « Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings ». Environmental Science and Technology, vol. 9. p. 1615-1621.
- Chan E.-C., J. Kuo, H.-P. Lin et D.-G. Mou. 1991. « Stimulation of *n*-alkane conversion to dicarboxylic acid by organic-solvent- and detergent-treated microbes ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 34. p. 772-777.
- Chen S.-H. et M. D. Aitken. 1999. « Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15 ». Environmental Science and Technology, vol. 33. p. 435-439.
- Churchill P. F. et S. A. Churchill. 1997. « Surfactant-enhanced biodegradation of solid alkanes ». Journal of Environmental Science and Health, vol. 32. p. 293-306.
- Churchill S. A., J. P. Harper et P. F. Churchill. 1999. « Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 549-552.
- Coates J. D., R. T. Anderson et D. R. Lovley. 1996. « Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 1099-1101.
- Collins L. D. et A. J. Daugulis. 1996. « Use of a two phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol ». Biotechnology Techniques, vol. 10. p. 643-648.
- Collins L. D. et A. J. Daugulis. 1997. « Biodegradation of phenol at high initial concentrations in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors ». Biotechnology and Bioengineering, vol. 55. p. 155-162.
- Collins L. D. et A. J. Daugulis. 1999a. « Benzene/toluene/*p*-xylene degradation. Part I. Solvent selection and toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 52. p. 354-359.

Collins L. D. et A. J. Daugulis. 1999b. « Benzene/toluene/*p*-xylene degradation. Part II. Effect of substrate interactions and feeding strategies in toluene/benzene and toluene/*p*-xylene fermentations in a partitioning bioreactor ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 52. p. 360-365.

Cornelissen G., H. Rigterink, M. A. Ferdinandy et C. M. Van Noort. 1998. « Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation ». Environmental Science and Technology, vol. 32. p. 966-970.

Cullen W. R., X.-F. Li et K. J. Reimer. 1994. « Degradation of phenanthrene and pyrene by microorganisms isolated from marine sediments and seawater ». The Science of Total Environment, vol. 156. p. 27-37.

Dagher F., É. Déziel, 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 ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 43. p. 368-377.

Daly K., A. C. Dixon, P. J. Swannell, J. E. Lepo et I. M. Head. 1997. « Diversity among aromatic hydrocarbon-degrading bacteria and their *meta*-cleavage genes ». Journal of Applied Microbiology, vol. 83. p. 421-429.

Dean-Raymond D. et R. Bartha. 1975. « Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum components by marine bacteria ». Developments in Industrial Microbiology, vol. 16. p. 97-110.

Dean-Ross D. et C. E. Cerniglia. 1996. « Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens* ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 46. p. 307-312.

Denome S. A., D. C. Stanley, E. S. Olson et K. D. Young. 1993. « Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains : Complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway ». Journal of Bacteriology, vol. 175. p. 6890-6901.

Desai J. D. et I. Banat. 1997. « Microbial production of surfactants and their commercial potential ». Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 61. p. 47-64.

Déziel É., G. Paquette, R. Villemur, F. Lépine et J.-G. Bisailon. 1996. « Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 1908-1912.

Déziel É., Y. Comeau et R. Villemur. 1999. « Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds ». Biodegradation, vol. 10. p. 219-233.

Dutta T. K., S. A. Selifonov et I. C. Gunsalus. 1998. « Oxidation of methyl-substituted naphthalenes : Pathways in a versatile *Sphingomonas paucimobilis* strain ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 1884-1889.

Duvnjak Z. et N. Kosaric. 1985. « Production and release of surfactant by *Corynebacterium lepus* in hydrocarbon and glucose media ». Biotechnology Letters, vol. 7. p. 793-796.

Dyksterhouse S. E., J. P. Gray, R. P. Herwig, J. C. Lara et J. T. Staley. 1995. « *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments ». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 45. p. 116-123.

- Efroymsen R. A. et M. Alexander. 1991. « Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57. p. 1441-1447.
- Efroymsen R. A. et M. Alexander. 1994. « Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids ». Environmental Science and Technology, vol. 28. p. 1172-1179.
- Efroymsen R. A. et M. Alexander. 1995. « Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids ». Environmental Science and Technology, vol. 29. p. 515-521.
- El Aalam S., A. Pauss et J.-M. Lebeault. 1993. « High efficiency styrene biodegradation in a biphasic organic/water continuous reactor ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 39. p. 696-699.
- Ensley B. D. et D. T. Gibson. 1983a. « Naphthalene dioxygenase : Purification and properties of a terminal oxygenase component ». Journal of Bacteriology, vol. 155. p. 505-511.
- Ensley B. D., B. J. Ratzhin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett et D. T. Gibson. 1983b. « Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo ». Science, vol. 222. p. 167-169.
- Erickson B. D. et F. J. Mondello. 1993. « Enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls after site-directed mutagenesis of a biphenyl dioxygenase gene ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 3858-3862.
- Fernandez M., B. Vlaken, P. Smith et A. Trevors. 1992. « Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal marine sediments ». Environmental Science and Technology, vol. 26. p. 817-829.
- Field J. A., E. De Jong, G. Feijoo Costa et A. M. de Bont. 1992. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 58. p. 2219-2226.
- Foght J. M. et W. S. Westlake. 1988. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 34. p. 1135-1141.
- Fu M. H. et M. Alexander. 1995. « Use of surfactants and slurring to enhance the biodegradation in soil of compounds initially dissolved in nonaqueous-phase liquids ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 43. p. 551-558.
- Fuenmayor S. L., M. Wild, A. L. Boyes et P. A. Williams. 1998. « A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2 ». Journal of Bacteriology, vol. 180. p. 2522-2530.
- Fuhrman J. A., K. McCallum et A. D. Davis. 1993. « Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 1294-1302.

- Gamerding A. P., R. S. Achin et R. W. Traxler. 1995. « Effect of aliphatic nonaqueous phase liquids on naphthalene degradation in multiphase systems ». Journal of Environmental Quality, vol. 24. p. 1150-1156.
- Gamo M. et T. Shoji. 1999. « A method of profiling microbial communities based on a most-probable-number assay that uses BIOLOG plates and multiple sole carbon sources ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 4419-4424.
- Garcia-Pichel F., L. Prufert-Bebout et G. Muyzer. 1996. « Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 3283-3291.
- Gardin H., J.-M. Lebeault et A. Pauss. 1999. « Biodegradation of xylene and butyl acetate using an aqueous-silicon oil two-phase system ». Biodegradation, vol. 10. p. 193-200.
- Gauthier M. J., B. Lafay, R. Christen, L. Fernandez, M. Acquaviva, P. Bonin et J.-C. Bertrand. 1992. « *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium ». International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 42. p. 568-576.
- Geiselbrecht A. D., B. P. Hedlund, M. A. Tichi et J. T. Staley. 1998. « Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strains ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 4703-4710.
- Georgiou, G. et S.-C. Lin. 1992. « Surface-active compounds from microorganisms ». Bio/Technology, vol. 10. p. 60-65.
- Genthner R. S., G. T. Townsend, S. E. Lantz et J. G. Mueller. 1997. « Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions ». Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 32. p. 99-105.
- Gibson D. T., V. Mahadevan, D. M. Jerina, H. Yagi et H. J. Yeh. 1975. « Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium ». Science, vol. 189. p. 295-297.
- Gibson D. T., S. M. Resnick, K. Lee, J. M. Brand, D. S. Torok, L. P. Wackett, M. J. Schocken et B. E. Haigler. 1995. « Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalysed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4 ». Journal of Bacteriology, vol. 177. p. 2615-2621.
- Goldstein R. M., L. M. Mallory et M. Alexander. 1985. « Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 50. p. 977-983.
- Goyal A. K. et G. J. Zylstra. 1996. « Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 230-236.

- Grifoll M., M. Casellas, J. M. Bayona et A. M. Solanas. 1992. « Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium : Identification of ring oxidation and ring fission products ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 2910-2917.
- Grifoll M., S. A. Selifonov et P. J. Chapman. 1994. « Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60. p. 2438-2449.
- Grifoll M., S. A. Selifonov, C. V. Gatlin et P. J. Chapman. 1995. « Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 3711-3723.
- Grosser R. J., D. Warshawsky et J. R. Vestal. 1991. « Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[*a*]pyrene and carbazole in soil ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57. p. 3462-3469.
- Grosser R. J., D. Warshawsky et J. R. Vestal. 1995. « Mineralization of polycyclic and *n*-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils ». Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 14. p. 375-382.
- Guerin T. 2000. « The differential removal of aged polycyclic aromatic hydrocarbons from soil during bioremediation ». Environmental Science & Pollution Research, vol. 7. p. 19-26.
- Guerin W. F. et G. E. Jones. 1988. « Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 937-944.
- Guerin W. F. et S. A. Boyd. 1995. « Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and an *Alcaligenes* sp. under different culture conditions ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 4061-4068.
- Guha S., C. A. Peters et P. R. Jaffé. 1999. « Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene and pyrene mixtures ». Biotechnology and Bioengineering, vol. 65. p. 491-499.
- Guieysse B. et B. Mattiasson. 1999. « Fast remediation of coal-tar-related compounds in biofilm bioreactors ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 52. p. 600-607.
- Hammel K. E., B. Kalyanaraman et T. K. Kirk. 1986. « Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[*p*]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase ». Journal of Biological Chemistry, vol. 261. p. 16948-16952.
- Hammel K. E., W. Z. Gai, B. Green et M. A. Moen. 1992. « Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium* ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 1832-1838.
- Head I. M. 1998. « Bioremediation : Towards a credible technology ». Microbiology, vol. 144. p. 599-608.
- Head I. M., J. R. Saunders et R. W. Pickup. 1998. « Microbial evolution, diversity, and ecology : a decade of ribosomal RNA of uncultivated microorganisms ». Microbial Ecology, vol. 35. p. 1-21.

- Hedlund B. P., A. D. Geiselbrecht, T. J. Bair et J. T. Staley. 1999. « Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 251-259.
- Heitkamp M. A. et C. E. Cerniglia. 1987. « The effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems ». Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 6. p. 535-546.
- Heitkamp M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller et C. E. Cerniglia. 1988a. « Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp. : Identification of ring oxidation and ring fission products ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 2556-2565.
- Heitkamp M. A., W. Franklin et C. E. Cerniglia. 1988b. « Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 2549-2555.
- Heitkamp M. A. et C. E. Cerniglia. 1988c. « Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 55. p. 1968-1973.
- Herrick J. B., K. G. Stuart-Keil, W. C. Ghiorse et E. L. Madsen. 1997. « Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria native to a coal tar-contaminated field site ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63. p. 2330-2337.
- Ho Y., M. Jackson, Y. Yang, J. G. Mueller et P. H. Pritchard. 2000. « Characterization of fluoranthene- and pyrene-degrading bacteria isolated from PAH-contaminated soils and sediments ». Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 24. p. 100-112.
- Hommel R. K. 1990. « Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms ». Biodegradation, vol. 1. p. 107-119.
- Hughes J. B., D. M. Beckles, S. D. Chandra et C. H. Ward. 1997. « Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments ». Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 18. p. 152-160.
- Jackson C. R., E. E. Roden et P. F. Churchill. 1998. « Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with various dilutions of inoculum as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 5046-5048.
- Jimenez I. Y. et R. Bartha. 1996. « Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 2311-2316.
- Joannis C., M. L. Delia et J. P. Riba. 1998. « Comparison of four methods for quantification of biofilms in biphasic cultures ». Biotechnology Techniques, vol. 12. p. 777-782.
- Ju L. K. et C. S. Ho. 1989. « Oxygen diffusion coefficient and solubility in *n*-hexadecane ». Biotechnology and Bioengineering, vol. 34. p. 1221-1224.

- Juhasz A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley. 1997a. « Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[*a*]anthracene and dibenz[*a,h*]anthracene by *Burkholderia cepacia* ». Journal of Applied Microbiology, vol. 83. p. 189-198.
- Juhasz A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley. 1997b. « Degradation of benzo[*a*]pyrene, dibenz[*a,h*]anthracene and coronene by *Burkholderia cepacia* ». Water Science and Technology, vol. 36. p. 45-51.
- Juhasz A. L., G. A. Stanley et M. L. Britz. 2000. « Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003 ». Letters in Applied Microbiology, vol. 30. p. 396-401.
- Kaden D. A., R. A. Hites et W. G. Thilly. 1979. « Mutagenicity of soot and associated polycyclic aromatic hydrocarbons to *Salmonella typhimurium* ». Cancer Research, vol. 39. p. 4152-4159.
- Kanaly R. A., R. Bartha, S. Fogel et M. Findlay. 1997. « Biodegradation of [<sup>14</sup>C]benzo[*a*]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63. p. 4511-4515.
- Kanaly R. A. et R. Bartha. 1999. « Cometabolic mineralization of benzo[*a*]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil ». Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 18. p. 2186-2190.
- Kanaly R. A. et S. Harayama. 2000. « Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria ». Journal of Bacteriology, vol. 182. p. 2059-2067.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 4205-4211.
- Kästner M., M. Breuer-Jammali et B. Mahro. 1994. « Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 41. p. 267-273.
- Kästner M. et B. Mahro. 1996. « Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 44. p. 668-675.
- Kästner M., S. Streibich, M. Beyrer, H. H. Richnow et W. Fritsche. 1999. « Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C]anthracene in soil ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 1834-1842.
- Kauppi B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund et S. Ramaswamy. 1998. « Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase ». Structure, vol. 6. p. 571-586.
- Kazunga C. et M. D. Aitken. 2000. « Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 1917-1922.
- Keith L. H. et W. A. Telliard. 1979. « Priority pollutants. A perspective view ». Environmental Science and Technology, vol. 13. p. 416-423.



- Kelley I., J. P. Freeman et C. E. Cerniglia. 1990. « Identification of metabolites from degradation of naphthalene by a *Mycobacterium* sp. ». Biodegradation, vol. 1. p. 283-290.
- Kelley I. et C. E. Cerniglia. 1991. « The metabolism of fluoranthene by a species of *Mycobacterium* ». Journal of Industrial Microbiology, vol. 7. p. 19-26.
- Kelley I., J. P. Freeman, F. E. Evans et C. E. Cerniglia. 1993. « Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 ». Applied and Environmental Microbiology, vol 59. p. 800-806.
- Kelley I. et C. E. Cerniglia. 1995. « Degradation of a mixture of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1 ». Journal of Soil Contamination, vol. 4. p. 77-91.
- Keuth S. et H.-J. Rehm. 1991. « Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 34. p. 804-808.
- Kirchmann H. et W. Ewnetu. 1998. « Biodegradation of petroleum-based oil wastes through composting ». Biodegradation, vol. 9. p. 151-156.
- Kirk T. K. et R. L. Farrel. 1987. « Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin ». Annual Review in Microbiology, vol. 41. p. 465-505.
- Kiyohara H. et K. Nagao. 1978. « The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria ». Journal of General Microbiology, vol. 105. p. 69-75.
- Kiyohara H., K. Nagao et K. Yana. 1982. « Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 43. p. 454-457.
- Kiyohara H., N. Takizawa et K. Nagao. 1992. « Natural distribution of bacteria metabolizing many kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons ». Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 74. p. 49-51.
- Köhler A., M. Schüttoff, D. Bryniok et H.-J. Knackmuß. 1994. « Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system ». Biodegradation, vol. 5. p. 93-103.
- Kramers P. G. et C. A. Van Der Heijden. 1988. « Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) : carcinogenicity data and risk extrapolations ». Toxicology and Environmental Chemistry, vol. 16. p. 341-351.
- Kotterman M. J., E. H. Vis et J. A. Field. 1998a. « Successive mineralization and detoxification of benzo[*a*]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 2853-2858.
- Kotterman M. J., H.-J. Rietberg, A. Hage et J. A. Field. 1998b. « Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants ». Biotechnology and Bioengineering, vol. 57. p. 220-227.

- Kurkela S., H. Lehtvaslaiho, E. T. Palva et T. H. Teeri. 1988. « Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816 ». Gene, vol. 73. p.355-362.
- Labare M. P. et M. Alexander. 1995. « Enhanced mineralization of organic compounds in nonaqueous-phase liquids ». Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 14. p. 257-265.
- Laha S. et R. G. Luthy. 1991. « Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems ». Environmental Science and Technology, vol. 25. p. 1920-1930.
- Lainesse M. 2000. « Isolement et caractérisation d'une souche bactérienne dégradant le chrysène ». Deuxième séminaire de maîtrise. INRS-Institut Armand-Frappier, 25 avril 2000.
- Langworthy D. E., R. D. Stapleton, G. S. Sayler et R. H. Findlay. 1998. « Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 3422-3428.
- Lantz S. E., M. T. Montgomery, W. W. Schultz, P. H. Pritchard, B. J. Spargo et J. G. Mueller. 1997. « Constituents of an organic wood preservative that inhibit the fluoranthene-degrading activity of *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505 ». Environmental Science and Technology, vol. 31. p. 3573-3580.
- Laor Y., P. F. Strom et W. J. Farmer. 1999. « Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid ». Water Research, vol. 33. p. 1719-1729.
- Launen L. A., L. J. Pinto et M. M. Moore. 1999. « Optimization of pyrene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response-surface methodology ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51. p. 510-515.
- Laurie A. D. et G. Lloyd-Jones. 1999. « The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism ». Journal of Bacteriology, vol. 181. p. 531-540.
- Leahy J. G. et R. R. Colwell. 1990. « Microbial degradation of hydrocarbons in the environment ». Microbiological Reviews, vol. 54. p. 305-315.
- Liebeg E. W. et T. J. Cutright. 1999. « The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil ». International Biodeterioration and Biodegradation, vol. 44. p. 55-64.
- Liu Z., A. M. Jacobson et R. G. Luthy. 1995. « Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 145-151.
- Löser C., H. Seidel, P. Hoffmann et A. Zehnsdorf. 1999. « Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 51. p. 105-111.
- Luthy R. G., G. R. Aiken, M. L. Brusseau, S. D. Cunningham, P. M. Gschwend, J. J. Pignatello, M. Reinhard, S. J. Traina, W. J. Weber et J. C. Westall. 1997. « Sequestration of hydrophobic organic contaminants by geosorbents ». Environmental Science and Technology, vol. 31. p. 3341-3347.

- MacNaughton S. J., J. R. Stephen, A. D. Venosa, G. A. Davis, Y.-J. Chang et D. C. White. 1999. « Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 3566-3574.
- MacRae J. D. et K. J. Hall. 1998. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment under denitrifying conditions ». Water Science and Technology, vol. 38. p. 177-185.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 2415-2423.
- Mahro B., K. Rode et V. Kasche. 1995. « Non-selective precultivation of bacteria able to degrade different polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Acta Biotechnology, vol. 15. p. 337-345.
- Manilal V. B. et M. Alexander. 1991. « Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 35. p. 401-405.
- Manohar S. et T. B. Karegoudar. 1998. « Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 49. p. 785-792.
- Marcoux J. 1998. « Étude de la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques de haut poids moléculaire en système multiphasique ». Mémoire de maîtrise, Montréal, Institut Armand-Frappier, 124 p.
- Marcoux J., É. 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 ». Journal of Applied Microbiology, vol. 88. p. 655-662.
- Marx D. et M. D. Aitken. 1999. « Quantification of chemotaxis to naphthalene by *Pseudomonas putida* G7 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 65. p. 2847-2852.
- McNally D. L., J. R. Mihelcic et D. R. Lueking. 1998. « Biodegradation of three- and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions ». Environmental Science and Technology, vol. 32. p. 2633-2639.
- McNally D. L., J. R. Mihelcic et D. R. Lueking. 1999. « Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions ». Chemosphere, vol. 38. p. 1313-1321.
- Menn F.-M., B. M. Applegate et G. S. Sayler. 1993. « NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 1938-1942.
- Meyer S. et H. Steinhart. 2000. « Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost mixture ». Chemosphere, vol. 40. p. 359-367.
- Mihelcic J. R. et R. G. Luthy. 1988a. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 1182-1187.

Mihelcic J. R. et R. G. Luthy. 1988b. « Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 54. p. 1188-1198.

Ministère de l'Environnement du Québec. Mars 1999. « Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés ». Critères génériques :  
pour les eaux : [www.menv.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe\\_2\\_grille\\_eaux.htm](http://www.menv.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2_grille_eaux.htm)  
pour les sols : [www.menv.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe\\_2\\_tableau\\_1.htm](http://www.menv.gouv.qc.ca/sol/terrains/politique/annexe_2_tableau_1.htm)

Molina M., R. Araujo et R. E. Hodson. 1999. « Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 45. p. 520-529.

Monna L., T. Omori et T. Kodama. 1993. « Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 285-289.

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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 55. p. 3085-3090.

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* ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 56. p. 1079-1086.

Mueller J. G., D. P. Middaugh, S. E. Lantz et P. J. Chapman. 1991. « Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: Chemical and biological assessment ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57. p. 1277-1285.

Mueller J. G., R. Devereux, D. L. Santavy, S. E. Lantz, S. G. Willis et P. H. Pritchard. 1997. « Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils ». Antonie van Leeuwenhoek, vol. 71. p. 329-343.

Munro D. R. et A. J. Daugulis. 1996. « The use of an organic solvent and integrated fermentation for improved xenobiotic degradation ». Resource and Environmental Biotechnology, vol. 1. p. 207-225.

Narro M. L., C. E. Cerniglia, C. Van Baalen et D. T. Gibson. 1992. « Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 58. p. 1351-1359.

Novotný C., P. Erbanová, V. Šásek, A. Kubátová, T. Cajthaml, E. Lang, J. Krahl et F. Zdražil. 1999. « Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi ». Biodegradation, vol. 10. p. 159-168.

Oberbremer A., R. Müller-Hurtig et F. Wagner. 1990. « Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 32. p. 485-489.

Ochsner U. A., T. Hembach et A. Fiechter. 1995. « Production of rhamnolipid biosurfactants ». Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, vol. 53. p. 89-118.

- Ogunseitán O. A., I. L. Delgado, Y.-L. Tsai et B. H. Olson. 1991. « Effect of 2-hydroxybenzoate on the maintenance of naphthalene-degrading pseudomonads in seeded and unseeded soil ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 57. p. 2873-2879.
- Ogunseitán O. A. et B. H. Olsen. 1993. « Effect of 2-hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 38. p. 799-807.
- Ortega-Calvo J.-J. et M. Alexander. 1994. « Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60. p. 2643-2646.
- Ortega-Calvo J.-J., I. Birman et M. Alexander. 1995. « Effects of varying the rate of partitioning of phenanthrene in nonaqueous-phase liquids on biodegradation in soil slurries ». Environmental Science and Technology, vol. 29. p. 2222-2225.
- Osswald P., P. Baveye et J. C. Block. 1996. « Bacterial influence on partitioning rate during the biodegradation of styrene in a biphasic aqueous-organic system ». Biodegradation, vol. 7. p. 297-302.
- Park K. S., R. C. Sims et R. Dupont. 1990. « Transformation of PAHs in soil systems ». Journal of Environmental Engineering, vol. 116. p. 632-640.
- Pinelli D., F. Fava, M. Nocentini et G. Pasquali. 1997. « Bioremediation of PAH-contaminated soil by using different aerobic batch bioreactor systems ». Journal of Soil Contamination, vol. 6. p. 243-256.
- Providenti A. M., H. Lee et J. T. Trevors. 1993. « Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds ». Journal of Industrial Microbiology, vol. 12. p. 379-395.
- Resnick S. M., K. Lee et D. T. Gibson. 1996. « Diverse reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816 ». Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, vol. 17. p. 438-457.
- Ressler B. P., H. Kneifel et J. Winter. 1999. « Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 53. p. 85-91.
- Richnow H. H., R. Seifert, M. Kästner, B. Mahro, B. Horsfield, U. Tiedgen, S. Böhm et W. Michaelis. 1995. « Rapid screening of PAH-residues in bioremediated soils ». Chemosphere, vol. 31. p. 3991-3999.
- Rockne K. J. et S. E. Strand. 1998. « Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments ». Environmental Science and Technology, vol. 32. p. 3962-3967.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 66. p. 1595-1601.
- Rosenberg M. 1991. « Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon : water interface ». Critical Reviews in Microbiology, vol. 18. p. 159-173.

- Sabaté J., M. Grifoll, M. Viñas et A. M. Solanas. 1999. « Isolation of a 2-methylphenanthrene utilizing bacterium : identification of ring cleavage metabolites ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 52. p. 704-712.
- Samantha S. K., A. K. Chakraborti et R. K. Jain. 1999. « Degradation of phenanthrene by different bacteria : evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 53. p. 98-107.
- Sanglard D., M. S. Leisola et A. Fliechter. 1986. « Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium* ». Enzyme Microbiology and Biotechnology, vol. 8. p. 209-212.
- Sanseverino J., B. M. Applegate, J. M. King et G. S. Saylor. 1993a. « Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 59. p. 1931-1937.
- Sanseverino J., C. Werner, J. Fleming, B. M. Applegate, J. M. King et G. C. Saylor. 1993b. « Molecular diagnostics of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in manufactured gas plant soils ». Biodegradation, vol. 4. p. 303-321.
- Schell M. A. 1985. « Transcriptional control of the *nah* and *sal* hydrocarbon-degrading operons by the *nahR* gene products ». Gene, vol. 36. p. 301-309.
- 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 ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 13-19.
- Schocken M. J. et D. T. Gibson. 1984. « Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 48. p. 10-16.
- Selifonov S. A., A. V. Slep'en'kin, V. M. Adanin, G. M. Grechkina et I. I. Starovoitov. 1993. « Acenaphthene catabolism by stains of *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes paradoxus* ». Microbiology, vol. 62. p. 85-91.
- Selifonov S. A., P. J. Chapman, S. B. Akkerman, J. E. Gurst, J. M. Bortiatynski, M. A. Nanny et P. G. Hatcher. 1998. « Use of <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance to assess fossil fuel biodegradation : Fate of [1-<sup>13</sup>C]acenaphthene in creosote polycyclic aromatic compound mixtures degraded by bacteria ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 1447-1453.
- Shaw L. J., Y. Beaton, L. A. Glover, K. Killham et A. A. Meharg. 1999. « Re-inoculation of autoclaved soil as a non-sterile treatment for xenobiotic sorption and biodegradation studies ». Applied Soil Ecology, vol. 11. p. 217-226.
- Shuttleworth K. L. et C. E. Cerniglia. 1995. « Environmental aspects of PAH biodegradation ». Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 54. p. 291-302.
- Shuttleworth K. L. et C. E. Cerniglia. 1996. « Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene ». Microbial Ecology, vol. 31. p. 305-317.

Simon M. J., T. D. Osslund, R. Saunders, B. D. Ensley, S. Suggs, A. Harcourt, W. C. Suen, D. L. Cruden, D. T. Gibson et G. J. Zylstra. 1993. « Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4 ». Gene, vol. 36. p. 301-309.

Singleton I. 1994. « Microbial metabolism of xenobiotics : Fundamental and applied research ». Journal of Chemical Technology and Biotechnology, vol. 59. p. 9-23.

Song H. et R. Bartha. 1990. « Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 56. p. 646-651.

Sotsky J. B., C. W. Greer et R. M. Atlas. 1994. « Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 40. p. 981-985.

Stapleton R. D., D. C. Savage, G. S. Saylor et G. Stacey. 1998. « Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 64. p. 4180-4184.

Stringfellow W. T. et M. D. Aitken. 1995a. « Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 61. p. 357-362.

Stringfellow W. T., S.-H. Chen et M. D. Aitken. 1995b. « Induction of PAH degradation in a phenanthrene-degrading pseudomonad ». In *Microbial Processes for Bioremediation*. Edited by Hinchee R. E., C. M. Vogel and F. J. Brockman : Battelle Press, Columbus. p. 83-89.

Stringfellow W. T. et L. Alvarez-Cohen. 1999. « Evaluating the relationship between the sorption of PAHs to bacterial biomass and biodegradation ». Water Research, vol. 33. p. 2535-2544.

Surovtseva E. G., V. S. Ivoilov et S. S. Belyaev. 1999. « Physiological and biochemical properties of *Beijerinckia mobilis* 1f Phn<sup>+</sup> capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons ». Microbiology, vol. 68. p. 746-750.

Sutherland J. B., J. P. Freeman, A. L. Selby, P. P. Fu, D. W. Miller et C. E. Cerniglia. 1990. « Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *Streptomyces flavovirens* ». Archives of Microbiology, vol. 154. p. 260-266.

Sutherland J. B. 1992. « Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi ». Journal of Industrial Microbiology, vol. 9. p. 53-62.

Sutherland J. B., F. Rafii, A. A. Khan et C. E. Cerniglia. 1995. « Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation ». In *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. Edited by Young L. Y. and C. E. Cerniglia : Wiley-Liss, New York. p. 269-306.

Sylvestre M. 1980. « Isolation method for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 39. p. 1223-1224.

Tadros M. G. et J. B. Hughes. 1997. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by indigenous mixed and pure cultures isolated from coastal sediments ». Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 63. p. 865-870.

- Tagger S., N. Truffaut et J. Le Petit. 1990. « Preliminary study on relationships among strains forming a bacterial community selected on naphthalene from a marine sediment ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 36. p. 676-681.
- Takizawa N., N. Kaida, S. Torigoe, T. Moritani, T. Sawada, S. Satoh et H. Kiyohara. 1994. « Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82 ». Journal of Bacteriology, vol. 176. p. 2444-2449.
- Tang J., M. J. Carroquino, B. K. Robertson et M. Alexander. 1998. « Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil ». Environmental Science and Technology, vol. 32. p. 3586-3590.
- Thomas J.-C., Y. St-Pierre, R. Beaudet et R. Villemur. 2000. « Monitoring by laser-flow-cytometry of the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Sphingomonas* sp. strain 107 during biotreatment of a contaminated soil ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 46. p. 433-440.
- Tiehm A. 1994. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 60. p. 258-263.
- Tiehm A. et C. Fritzsche. 1995. « Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 42. p. 964-968.
- Tongpim S. et M. A. Pickard. 1996. « Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 41. p. 289-294.
- Tongpim S. et M. A. Pickard. 1999. « Cometabolic oxidation of phenanthrene to phenanthrene *trans*-9,10-dihydrodiol by *Mycobacterium* strain S1 growing on anthracene in the presence of phenanthrene ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 45. p. 369-376.
- Trenz S. P., K. H. Engesser, P. Fischer et H.-J. Knackmuss. 1994. « Degradation of fluorene by *Brevibacterium* sp. strain DPO 1361 : A novel C-C bond cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one ». Journal of Bacteriology, vol. 176. p. 789-795.
- Trevors J. T. 1996. « Sterilization and inhibition of microbial activity in soil ». Journal of Microbiological Methods, vol. 26. p. 53-59.
- 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 ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 41. p. 470-476.
- Uraizee F. A., A. D. Venosa et M. T. Suidan. 1998. « A model for diffusion controlled bioavailability of crude oil components ». Biodegradation, vol. 8. p. 287-296.
- Van Hamme J. D. et O. P. Ward. 1999. « Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed-bacterial culture ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 45. p. 130-137.



- Van Hamme J. D., J. A. Odumeru et O. P. Ward. 2000. « Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 46. p. 441-450.
- Vanneck P., M. Beeckman, N. De Saeyer, S. D'Haene et W. Verstraete. 1995. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid-phase system ». In *Bioremediation of Recalcitrant Organics*, vol. 7. Edited by Hinchee R. E., D. B. Anderson and R. E. Hoepfel : Battelle Press, Columbus. p 55-62.
- Varanasi U. et J. E. Stein. 1991. « Disposition of xenobiotic chemicals and metabolites in marine organisms ». Environmental Health Perspectives, vol. 90. p. 93-100.
- Volkering F. A., A. M. Breure, A. Sterkenburg et J. G. Van Andel. 1992. « Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons : Effect of substrate availability on bacterial growth kinetics ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 36. p. 548-552.
- Walter U., M. Beyer, J. Klein et H.-J. Rehm. 1991. « Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1 ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 34. p. 671-676.
- Wang Y., P. K. Lau et D. K. Button. 1996. « A marine oligobacterium harboring genes known to be part of aromatic hydrocarbon degradation pathways of soil *Pseudomonas* ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 62. p. 2169-2173.
- Weissenfels W. D., M. Beyer et J. Klein. 1990. « Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 32. p. 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 ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 34. p. 528-535.
- Weissenfels W. D., H.-J. Klewer et J. Langhoff. 1992. « Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles : Influence on biodegradability and biotoxicity ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 36. p. 689-696.
- Whitman B. E., D. R. Lueking et J. R. Mihelcic. 1998. « Naphthalene uptake by a *Pseudomonas fluorescens* isolate ». Canadian Journal of Microbiology, vol. 44. p. 1086-1093.
- Willumsen P. A., U. Karlson et P. H. Pritchard. 1998. « Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants ». Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 50. p. 475-483.
- Willumsen P. A. et E. Arvin. 1999. « Kinetics of degradation of surfactant-solubilized fluoranthene by a *Sphingomonas paucimobilis* ». Environmental Science and Technology, vol. 33. p. 2571-2578.
- Wodzinski R. S. et J. E. Coyle. 1974. « Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria ». Applied Microbiology, vol. 27. p. 1081-1084.
- Wodzinski R. et D. Larocca. 1977. « Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naphthalene-heptamethylnonane mixtures ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 33. p. 660-665.

- Wolf D. C., T. H. Dao, H. D. Scott et T. L. Lavy. 1989. « Influence of sterilization methods on selected soil microbiological, physical, and chemical properties ». Journal of Environmental Quality, vol. 18. p. 39-44.
- Woodley J. M., A. J. Brazier et M. D. Lilly. 1991. « Lewis cells studies to determine reactor design data for two-liquid-phase bacterial and enzymatic reactions ». Biotechnology and Bioengineering, vol. 37. p. 133-140.
- Yang Y., R. F. Chen et M. P. Shiaris. 1994. « Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene : Preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816 ». Journal of Bacteriology, vol. 176. p. 2158-2164.
- Ye D., M. A. Siddiqi, A. E. MacCubbin, S. Kumar et H. C. Sikka. 1996. « Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis* ». Environmental Science and Technology, vol. 30. p. 136-142.
- Zaidi B. R. et S. H. Imam. 1999. « Factors affecting microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the Caribbean coastal water ». Marine Pollution Bulletin, vol. 38. p. 737-742.
- Zhang X. et L. Y. Young. 1997. « Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia ». Applied and Environmental Microbiology, vol. 63. p. 4759-4764.
- Zhou J. Z. et J. M. Tiedje. 1995. « Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium ». Molecular Ecology, vol. 4. p. 613-618.
- Zylstra G. J., X. P. Wang, E. Kim et V. A. Didolkar. 1994. « Cloning and analysis of the genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation ». Annual New York Academy Science, vol. 721. p. 386-398.