

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Isolement et caractérisation d'une souche bactérienne
dégradant le chrysène**

par

Marco Lainesse

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

Claude Dupont, centre de
Microbiologie et Biotechnologie

Examineur externe

Roger Guay
Département de Biologie Médicale
Université Laval

Directeur de recherche

Jean-Guy Bisaillon, centre de
Microbiologie et Biotechnologie

Codirecteur de recherche

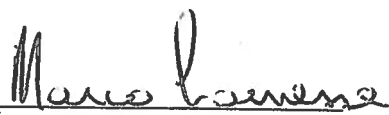
Pierre Juteau, centre de
Microbiologie et Biotechnologie

RÉSUMÉ

Dû à la faible solubilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) lourds en milieux aqueux et à leur adsorption sur la matière organique du sol, très peu de micro-organismes capables de dégrader ce type de molécule ont été isolés. Ces problèmes ont été contournés par l'utilisation de cultures biphasiques (milieu aqueux avec huile de silicone). Celles-ci ont permis l'isolement d'une bactérie (souche ML1) capable de dégrader le chrysène, un HAP lourd à 4 cycles aromatiques très récalcitrant. La comparaison de la séquence de son gène de l'ARNr 16S à celles d'une banque de données a montré qu'elle appartenait au genre *Sphingomonas*.

Les études effectuées avec *Sphingomonas* sp. ML1 ont montré que la dégradation du chrysène est plus rapide en système biphasique qu'en système monophasique (sans huile) avec des vitesses moyennes et maximales de dégradation observées de 1.4 et 3.3 mg/L-j, respectivement, pour les cultures biphasiques et de 0,9 et 2.9 mg/L-j pour les cultures monophasiques. Ces taux de dégradation sont parmi les plus élevés rapportés dans les écrits scientifiques. Des essais de dégradation avec du ^{14}C -chrysène ont montré que la souche ML1 minéralise le chrysène (^{14}C -chrysène $\rightarrow$ $^{14}\text{CO}_2$ + H_2O). La souche peut aussi utiliser le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène ainsi que le benz[a]anthracène comme seule source de carbone. Pour le pyrène, le benzo[a]pyrène, le pérylène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène et le dibenz[a,h]anthracène, il y a une légère dégradation mais seulement par co-métabolisme en présence de chrysène.

La dégradation du chrysène nécessite la présence de sol ou d'un extrait aqueux de sol. Les éléments de cet extrait qui induisent la dégradation du chrysène ont été adsorbés sur charbon activé et désorbés avec du méthanol. L'analyse de cette fraction par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse suggère que cet inducteur serait un disaccharide.


Étudiant


Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Jean-Guy Bisailon, pour son dévouement, son appui et sa disponibilité tout le long de ce travail de recherche. Il est aussi primordial de mentionner la contribution de mon co-directeur de recherche, Dr Pierre Juteau, pour sa patience, son expertise et ses nombreux conseils fort appréciés.

Mes remerciements vont également au Dr Richard Villemur, au Dr Réjean Beaudet au Dr François Lépine et au Dr Eric Déziel pour leurs conseils et leurs opinions de même qu'à l'ensemble de l'équipe technique, M. Sylvain Milot, M. Louis Racine, Mme Rita Alary et Mme Francine Turcotte pour leurs expertises que ce soit en chimie analytique, en microbiologie ou en biologie moléculaire.

Merci également à mes collègues de travail, Marie-France Duckett, Jarek Letowski et Louis Racine pour la bonne ambiance qu'ils ont su maintenir au laboratoire et les deux bonnes années inoubliables passées ensemble.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	II
REMERCIEMENTS.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	VII
LISTE DES FIGURES.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1 Les sols contaminés.....	5
1.1 Contamination par les hydrocarbures.....	5
1.2 Classes d'hydrocarbures.....	5
1.3 Hydrocarbures aromatiques polycycliques	6
1.4 Normes	8
2 Traitements des sols	9
2.1 Procédés thermiques et physico-chimiques.....	9
2.2 Procédés biologiques.....	10
2.2.1 Traitement <i>In situ</i>	10
2.2.2 Traitement <i>Ex situ</i>	11
3 Biodégradation des HAP	11
3.1 Généralités.....	11
3.2 Biodégradation des HAP par des souches bactériennes.....	12
3.2.1 Généralités.....	12
3.2.2 HAP à 4 cycles	15
3.2.2.1 Fluoranthène.....	15
3.2.2.2 Pyrène.....	16
3.2.2.3 Benz[<i>a</i>]anthracène.....	18
3.2.2.4 Chrysène.....	19
3.2.3 HAP de 5 cycles et plus	20
3.3 Biodégradation des HAP par des champignons.....	21
3.4 Voies métaboliques	23
4 Augmentation de la biodisponibilité des HAP	25
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	28
1 Isolement d'une souche bactérienne dégradant le chrysène.....	29
1.1 Flore indigène de la sablière Thouin.....	29
1.2 Techniques d'isolement.....	30
1.2.1 Milieux de culture biphasiques	30
1.2.2 Repiquages et dilutions	30
1.2.3 Cultures sur gélose	31
2 Conservation de la souche ML1	32
3 Identification	32
3.1 Séquençage de gène de l'ARNr 16S	32

3.2	Analyses biochimiques.....	35
3.3	Présence de gènes de dégradation des HAP.....	35
3.3.1	Préparation de l'ADN génomique.....	35
3.3.2	Réaction de PCR.....	36
4	Conditions de culture standard.....	36
4.1	Préparation de l'inoculum.....	36
4.2	Cultures biphasiques.....	36
4.3	Cultures monophasiques.....	37
5	Spectre de dégradation des HAP.....	38
5.1	HAP seuls.....	38
5.2	Chrysène avec autres HAP.....	38
5.3	Minéralisation.....	39
6	Importance du sol pour la dégradation du chrysène.....	40
6.1	Confirmation de l'importance du sol.....	40
6.2	Extrait aqueux de sol.....	40
6.3	Activation de la souche ML1 avec un extrait aqueux de sol.....	41
6.4	Extraits de sol avec solvants.....	41
6.5	Extraits de sol avec charbon activé.....	42
6.6	Analyse de l'extrait aqueux par HPLC et par spectrométrie de masse.....	42
6.7	Remplacement du sol par d'autres matières organiques.....	43
6.8	Remplacement du sol par des vitamines et des minéraux.....	43
6.9	Cultures biphasiques en milieu plus riche.....	44
7	Courbe de croissance.....	44
8	Identification des intermédiaires de dégradation du chrysène.....	45
8.1	Analyse de cultures monophasiques.....	45
8.2	Analyse de cultures biphasiques.....	45
9	Analyses chimiques.....	46
9.1	HPLC.....	46
9.1.1	Analyse des HAP.....	46
9.1.2	Analyse des intermédiaires de dégradation et des éléments du sol favorables à la dégradation du chrysène.....	47
9.2	GC-MS.....	47
9.3	LC-MS.....	48
RÉSULTATS.....		49
1	Identification de la souche ML1.....	50
1.1	Caractéristiques biochimiques de la souche ML1.....	50
1.2	Séquençage du gène de l'ARNr 16S.....	50
2	Cultures biphasiques vs monophasiques.....	51
3	Spectre d'activité de la souche ML1.....	53
3.1	Cultures biphasiques avec HAP de 3 cycles.....	53
3.2	Cultures biphasiques avec HAP de 4 cycles.....	53
3.3	Cultures biphasiques avec HAP de 5 cycles.....	58
3.4	Cultures biphasiques avec HAP de 6 cycles.....	58
4	Minéralisation du chrysène.....	60
5	Importance du sol pour la dégradation du chrysène.....	60

5.1	Cultures avec différentes fractions du sol	60
5.2	Induction des voies de dégradation du chrysène	60
5.3	Cultures biphasiques avec extraits de sol	64
5.3.1	Extraction par solvants organiques	64
5.3.2	Extraction sur phase solide	64
5.4	Cultures biphasiques en milieux plus riches	67
5.5	Cultures biphasiques avec différents ajouts	67
6	Courbe de croissance	67
7	Présence des gènes de dégradation des HAP	71
8	Identification du composé du sol responsable de l'activation de la voie de dégradation du chrysène	74
9	Identification des intermédiaires de dégradation du chrysène	76
DISCUSSION		78
1	Souche dégradant le chrysène	79
1.1	Isolement	79
1.2	Identification	79
1.3	Capacités de dégradation du chrysène	80
2	Spectre de dégradation des HAP	81
3	Interactions	84
4	Voie métabolique de la souche ML1	85
4.1	Minéralisation du chrysène	85
4.2	Cinétique de dégradation	86
4.3	Intermédiaires de dégradation	87
4.4	Gènes cataboliques	87
5	Activation de la voie catabolique du chrysène	89
6	Composé responsable de l'activation de la dégradation du chrysène	90
CONCLUSION		92
BIBLIOGRAPHIE		94

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 : Grille des critères de contamination aux HAP	8
Tableau 2 : Micro-organismes dégradant les HAP	13
Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques de la souche ML1	50
Tableau 4 : Homologies avec le gène de l'ARNr 16S de la souche ML1	51
Tableau 5 : Spectre de dégradation des HAP de 3 et 4 cycles par la souche ML1	54
Tableau 6 : Spectre de dégradation des HAP de 5 à 6 cycles par la souche ML1	59

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1 : Structure chimique de quelques HAP	6
Figure 2 : Mécanismes de dégradation des HAP	24
Figure 3 : Comparaison de la dégradation du chrysène par la souche ML1 en cultures monophasiques et biphasiques	52
Figure 4 : Biodégradation du chrysène par la souche ML1	55
Figure 5 : Biodégradation du fluoranthène par la souche ML1	56
Figure 6 : Biodégradation du pyrène par la souche ML1	57
Figure 7 : Minéralisation et dégradation du chrysène par la souche ML1	61
Figure 8 : Cultures biphasiques avec différentes fractions du sol	62
Figure 9 : Cultures biphasiques avec souche ML1 activée	63
Figure 10 : Cultures biphasiques avec des extraits de sol réalisés avec différents solvants organiques	65
Figure 11 : Cultures biphasiques avec des extraits réalisés sur charbon activé	66
Figure 12 : Cultures biphasiques en milieu plus riche	68
Figure 13 : Cultures biphasiques avec divers ajouts	69
Figure 14 : Courbe de croissance de la souche ML1	70
Figure 15 : Présence des gènes de dégradation des HAP avec une température d'hybridation des amorces de 55°C	72
Figure 16 : Présence des gènes de dégradation des HAP avec une température d'hybridation des amorces de 50°C	73
Figure 17 : Chromatogramme de l'extrait de sol obtenu à l'aide de charbon activé et de méthanol	75
Figure 18 : Comparaison des chromatogramme et spectre de masse de divers composés	76
Figure 19 : Chromatogramme et spectre de masse des intermédiaires de dégradation du chrysène	77

INTRODUCTION

L'industrialisation survenue au cours du dernier siècle avec l'apparition d'une large gamme de produits manufacturés, l'exploitation pétrolière, l'industrie des pâtes et papiers et l'agriculture à grande échelle a été bénéfique à plusieurs points de vue, que ce soit l'accessibilité à divers produits avant réservés aux plus fortunés ou l'amélioration générale de la condition de vie humaine. L'envers de la médaille est qu'avec l'industrialisation est venu le problème de l'élimination des résidus de production ainsi que le déversement accidentel dans l'environnement de produits chimiques ou pétroliers nécessaires pour cette production. Jusqu'au début des années 80, les lois pour protéger l'environnement étant peu contraignante, les producteurs de résidus industriels ont pu s'en départir soit en allant les enfouir à faibles coûts dans les dépotoirs municipaux ou industriels, sur le site même de production ou simplement en s'en débarrassant dans des sites clandestins.

Il en résulte donc qu'aujourd'hui, en Amérique du Nord, la quantité de sols contaminés est considérable. En 1994, aux États-Unis, plus de 50 000 sites officiellement considérés comme contaminés avaient été répertoriés (Singleton, 1994). Seulement sur le territoire Québécois, plus de 1870 sites contaminés ont été répertoriés par le Ministère de l'Environnement et de la Faune, sans tenir compte des quelques 17 000 réservoirs d'essences souterrains qui laissent échapper des hydrocarbures (Samson, 1994a). De ces sites contaminés, plus de la moitié le sont par des hydrocarbures et dans le deux-tiers de ces cas, par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Les HAP sont formés par la fusion d'au moins deux cycles de benzène et sont classés en deux groupes selon le nombre de cycles aromatiques qu'ils possèdent. Il y a les HAP de faible poids moléculaire (HAP légers), c'est-à-dire ceux ayant 3 cycles et moins, et les HAP de haut poids moléculaire (HAP lourds), ceux ayant plus de 3 cycles. Les HAP sont une famille de composés caractérisés par leur faible solubilité en milieux aqueux, leur récalcitrance dans l'environnement et leur toxicité qui croît avec l'augmentation du poids moléculaire du composé (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1993; Kanaly, 2000). Ils sont présents de façon naturelle dans le pétrole et sont principalement formés lors de la combustion incomplète de la matière organique. Une

fois dans l'environnement, les HAP sont susceptibles d'être affectés par des phénomènes tels que la volatilisation, la photo-oxydation, l'oxydation chimique, la dissolution sélective, l'adsorption à la matière organique du sol, la bioaccumulation, la migration, l'absorption par des plantes et la dégradation microbiologique (Bouchez *et al.*, 1996a; Cerniglia, 1992).

Lorsqu'un site est considéré comme étant contaminé aux HAP, il existe plusieurs technologies disponibles pour remédier au problème. La biodégradation est basée sur les capacités enzymatiques de certains micro-organismes à dégrader les HAP et a l'avantage d'être moins coûteuse, plus respectueuse pour l'environnement et mieux acceptée par le public que les procédés thermiques ou physico-chimiques (Bossert *et al.*, 1984; Deziel, 1997; Sims et Overcash, 1983). Très efficace pour le traitement des HAP légers, elle l'est beaucoup moins pour les autres HAP. L'application de tels traitements pour les sols contaminés aux HAP lourds obtient donc pour le moment un succès limité. Un des problèmes vient de la faible biodisponibilité de ces HAP et par conséquent, très peu de micro-organismes capables de dégrader ces molécules ont été isolés par rapport à ceux pouvant dégrader les HAP légers (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1984, 1993; Kanaly, 2000). Il existe donc un intérêt à isoler et étudier des souches bactériennes pouvant dégrader les HAP lourds dans le but de mettre sur pied des biotraitements plus efficaces.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à l'isolement et à l'étude d'une souche bactérienne pouvant dégrader le chrysène, un HAP lourd à 4 cycles aromatiques caractérisé par sa très faible solubilité en milieux aqueux et par son potentiel cancérigène. Le choix de ce HAP a été motivé par le fait qu'il est reconnu comme étant plutôt récalcitrant à la dégradation et que très peu de micro-organismes ont été isolés pouvant le dégrader. Afin d'obtenir une souche bactérienne pouvant dégrader le chrysène, des cultures liquides contenant le chrysène comme source majeure de carbone ont étéensemencées avec la microflore indigène retrouvée dans un sol contaminé aux hydrocarbures. Le chrysène étant très peu soluble en milieu aqueux, des cultures biphasiques ont été utilisées. Celles-ci étaient constituées d'une phase aqueuse et d'une phase hydrophobe, l'huile de silicone, dans laquelle le chrysène était dissout. Ce type de culture permet d'augmenter l'accessibilité du composé aux micro-organismes présents

dans la phase aqueuse et ainsi augmenter la biodisponibilité du chrysène. La souche bactérienne ainsi isolée a été identifiée et caractérisée.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les sols contaminés

1.1 Contamination par les hydrocarbures

Le raffinement, le transport, la distribution ainsi que l'utilisation humaine de produits pétroliers depuis le dernier siècle sont à l'origine des problèmes reliés à la contamination par les hydrocarbures. Chaque année, des quantités importantes de pétrole et de produits pétroliers sont déversées accidentellement dans l'environnement. Les hydrocarbures se sont retrouvés dans nos océans et sur les plages lors des déversements de pétroliers et dans le sol et l'eau souterraine avec les fuites de pipelines et de réservoirs souterrains. (Atlas et Cerniglia, 1995; Bossert *et al.*, 1984; Heitkamp et Cerniglia, 1987). Malgré le fait que ce sont les grands déversements pétroliers, avec leur couverture médiatique et leurs photos d'oiseaux et d'animaux marins enduits de pétrole, qui attirent le plus notre attention, ce sont en fait les contaminations provenant de la surface des routes, de petites fuites dans les vieux réservoirs souterrains troués, des déchets domestiques ou du mauvais recyclage des huiles à moteurs usées qui sont à l'origine de la majeure partie de la pollution (Atlas et Cerniglia, 1995; Morgan et Watkinson, 1989).

Au Québec, selon un recensement effectué en 1992 par le Ministère des Ressources Naturelles, sur les quelques 50 000 réservoirs présents sur le sol québécois, plus de 17 000 réservoirs laissent échapper des hydrocarbures (Samson, 1994a). Aux États-Unis, ce chiffre est estimé à plus de 250 000 (Atlas et Cerniglia, 1995). Malgré le fait que le gouvernement québécois ait ordonné que tous les réservoirs souterrains soient remplacés avant 2001, la majorité de ces sites sont déjà considérés comme contaminés (Samson, 1994b). Des quelques 800 sites contaminés au Québec qui ont été répertoriés par le Ministère de l'Environnement et de la Faune (MEF) en 1993, 60 % sont contaminés par des hydrocarbures (Samson, 1994a). Parmi ceux-ci, les HAP constituent les contaminants majeurs et ce, dans le deux-tiers de ces sites. Une mise à jour effectuée en mai 1996 a porté ce chiffre à plus de 1870 sites contaminés au Québec.

1.2 Classes d'hydrocarbures

Les hydrocarbures peuvent être regroupés en quatre classes : les aliphatiques, les asphaltènes, les résines et les aromatiques (Leahy et Colwell, 1990; Walker et Colwell, 1976). Les aliphatiques sont des composés avec de longues chaînes de carbone qui

peuvent être linéaires, ramifiés ou cycliques et sont les plus facilement dégradés par les micro-organismes (Atlas, 1981). Les asphaltènes regroupent des composés tels que les acides carboxyliques, les cétones, les esters et les porphyrines. Ils sont des composés de haut poids moléculaire avec de longues chaînes de carbones. Les résines font aussi partie des hydrocarbures de haut poids moléculaire et regroupent les pyridines, les sulfoxides et les amides (Walker et Colwell, 1976).

1.3 Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les HAP font partie d'un large groupe de composés organiques contenant au minimum deux noyaux aromatiques et ayant une variété de configurations structurales. Ils sont formés à la base par la fusion de deux noyaux aromatiques de benzène et peuvent être disposés de façon linéaires (anthracène), à angles (fluoranthène) ou groupés (pyrène) (figure 1). Les propriétés chimiques ainsi que la persistance dans l'environnement des

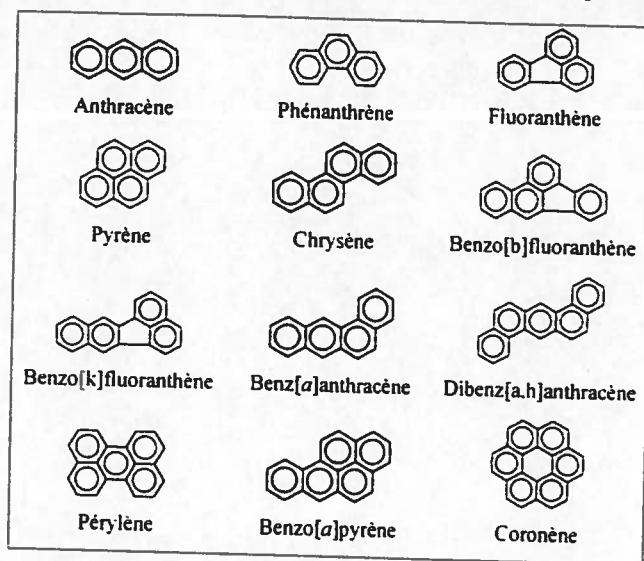


Figure 1 : Structure chimique de quelques HAP

HAP sont largement dépendantes du poids moléculaire, c'est-à-dire du nombre de cycles aromatiques et de l'arrangement des noyaux aromatiques, les HAP angulaires étant plus stables que les HAP linéaires (Blumer, 1976; Bouchez *et al.*, 1996a; Kanaly, 2000). De façon générale, plus le poids moléculaire et le nombre de liaisons entre les noyaux aromatiques augmentent, plus les

HAP sont hydrophobes et stables (Harvey, 1997; Zander, 1983). Cette stabilité moléculaire ainsi que leur hydrophobicité sont les deux principaux facteurs qui contribuent à la persistance des HAP lourds (HAP ayant 4 cycles et plus) dans l'environnement. De plus, par leurs propriétés liposolubles, les HAP ont tendance à s'accumuler en haut de la chaîne alimentaire (Kanaly, 2000) ou certains d'entre eux ont des effets toxiques et/ou possèdent des effets cancérigènes, tératogènes ou mutagènes

(Cerniglia, 1993). Les propriétés génotoxiques des HAP tendent aussi à augmenter avec le nombre de noyaux jusqu'à la présence d'au moins 4 ou 5 noyaux de benzène (Cerniglia *et al.*, 1992; World Health Organization (WHO), 1998). Pour ces raisons, les HAP sont classés parmi les polluants prioritaires par les agences de protection de l'environnement au Canada ainsi qu'aux États-Unis (Keith et Telliard, 1979; Meek *et al.*, 1994).

Présents de façon naturelle dans le pétrole, les HAP sont principalement formés lors de la combustion incomplète de la matière organique. Les principales sources de contamination proviennent des activités industrielles telles que le raffinage et le transport du pétrole ainsi que de la production d'aluminium et d'acier. D'autres sources importantes de HAP dans l'environnement sont l'incinération de déchets, le chauffage industriel et résidentiel, les émissions de véhicules, la fumée de tabac, les incendies de forêts et les éruptions volcaniques. Les HAP peuvent aussi être formés de façon biogénique par des réactions de biosynthèse de plantes ou de micro-organismes (Blumer, 1976). Toutes ces sources de contamination naturelle ou anthropogène résultent en une distribution mondiale des HAP. Les HAP peuvent ainsi être détectés dans l'air, dans le sol, dans l'eau souterraine, dans l'eau de surface ainsi que dans les écoulements d'égouts (Bouchez *et al.*, 1996a; Kanaly, 2000; WHO, 1998).

Une fois libérés dans l'environnement, le devenir des HAP dépend largement de la source de contamination, atmosphérique ou aqueuse, qui aura un effet sur la transformation et l'évolution ultime des HAP libérés (Bouchez *et al.*, 1996a; Vogt *et al.*, 1987). De façon générale, une fois dans l'environnement, les HAP sont susceptibles d'être affectés par des phénomènes tels que la volatilisation, la photo-oxydation, l'oxydation chimique, la dissolution sélective, l'adsorption à la matière organique du sol, la bioaccumulation, la migration, l'absorption par des plantes et la dégradation microbiologique (Bouchez *et al.*, 1996a; Cerniglia, 1992). La biodégradation repose sur les systèmes enzymatiques de certains micro-organismes pour dégrader les HAP et est considérée comme le processus de détoxification naturelle le plus important (Bossert *et al.*, 1984; Deziel, 1997; Sims et Overcash, 1983).

1.4 Normes

Le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec a établi une grille de critères indicatifs de la contamination des sols et de l'eau souterraine pour divers composés tels que les métaux, les polluants minéraux, les composés aromatiques monocycliques volatils, les composés phénoliques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les hydrocarbures chlorés et les pesticides. Cette grille a été créée pour servir de guide lors de l'évaluation d'un site et les valeurs qu'elle contient ne sont pas contraignantes. Chaque site contaminé ainsi que les risques posés pour l'environnement sont évalués de façon individuelle. Pour chacun des composés contenus dans la grille, il y a trois valeurs seuils, séparées selon les lettres A, B et C où C est la valeur supérieure, qui servent à déterminer les plages d'interventions appropriées (tableau 1).

Tableau 1 : Grille des critères de contamination aux HAP

	Sol (mg/kg)			Eau souterraine (µg/L)		
	A	B	C	A	B	C
Anthracène	< 0,1	10	100	< 0,5	7	20
Fluoranthène	< 0,1	10	100	< 0,1	2	10
Phénanthrène	< 0,1	5	50	< 0,1	1	5
Pyrène	< 0,1	10	100	< 0,2	7	30
Chrysène	< 0,1	1	10	< 0,1	1	5
Benz[a]anthracène	< 0,1	1	10	< 0,1	0,5	2
Benzo[a]pyrène	< 0,1	1	10	< 0,1	0,2	1
Benzo[b]fluoranthène	< 0,1	1	10	< 0,1	0,2	1
Dibenz[a,h]anthracène	< 0,1	1	10	< 0,1	0,2	1
HAP (somme)	1	20	200	0,2	10	50

Le seuil A représente le bruit de fond et correspond à des valeurs inférieures à 0,1 mg par kg de sol pour chacun des HAP et 1 mg par kg de sol pour la somme. Dans la plage d'interventions A-B, le sol et l'eau souterraine sont considérés comme faiblement

contaminés. Dans ces conditions, l'eau souterraine ne peut être utilisée comme source d'eau potable puisqu'elle ne répond plus aux normes de qualité. Pour ce qui est du sol, il ne peut être utilisé comme sol de surface dans un secteur agricole ou dans un quartier résidentiel. Habituellement, à ce niveau de contamination, il n'y aura pas de travaux de décontamination entrepris mais certaines mesures de protection comme l'excavation d'une couche superficielle ou l'addition d'une couche de terre propre peuvent être envisagées. Dans la plage B-C, le sol et l'eau souterraine sont contaminés. Les sols inclus dans cette plage devront être décontaminés s'ils risquent d'avoir un impact négatif sur la nappe phréatique. Ces sols peuvent seulement servir à des fins commerciales ou industrielles. À partir du seuil C, les sols sont considérés comme fortement contaminés et des travaux de décontamination devront être entrepris avant qu'ils puissent être utilisés (Beaulieu et Drouin, 1998).

2 Traitements des sols

2.1 Procédés thermiques et physico-chimiques

Les procédés thermiques utilisent des fourneaux ou des incinérateurs pour évaporer ou détruire les hydrocarbures. Elle est la meilleure solution pour traiter un sol fortement contaminé et a l'avantage d'être rapide et efficace. Cette technique nécessite cependant l'excavation du sol et le transport au lieu de traitement ainsi que le traitement des gaz d'échappements (Morgan et Watkinson, 1989). En plus d'être très énergivore et coûteuse (jusqu'à 1000 \$/tonne), l'incinération n'est pas très bien acceptée par le public et enlève toute trace de matière organique dans le sol ce qui le rend inutilisable pour l'agriculture ou pour l'établissement d'un nouvel écosystème.

Les procédés physico-chimiques utilisent des techniques comme l'extraction à l'air, aux solvants ou aux détergents, l'immobilisation du sol, l'inondation et le pompage de l'eau souterraine. Certaines de ces techniques ont l'avantage d'être moins coûteuses (60-300 \$/tonne), mieux acceptées par le public et plus respectueuses pour l'environnement que l'incinération. Elles nécessitent quand même l'installation d'infrastructures assez complexes et ne font que déplacer le problème puisque les

polluants récupérés devront toujours être éliminés (Morgan et Watkinson, 1989; Samson, 1994a).

2.2 Procédés biologiques

Ce genre de traitements remonte à la fin des années 60 et au début des années 70. lors d'études effectuées par la marine américaine sur les techniques de dépollution des océans. À partir d'études portant sur la biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes, la biorestauration est née (Atlas et Cerniglia, 1995). Elle repose sur la capacité des micro-organismes à dégrader les composés organiques polluants en sous-produits inoffensifs comme l'eau, le dioxyde de carbone et la biomasse (Singleton, 1994). Ayant l'avantage d'être économique (40-150 \$/tonne), efficace et versatile, la biodégradation des hydrocarbures par les micro-organismes est aussi l'un des mécanismes primaires de son élimination dans l'environnement (Atlas et Cerniglia, 1995; Morgan et Watkinson, 1989). Par rapport à d'autres traitements comme l'incinération, elle peut cependant s'avérer plus longue dans certains cas. La complexité du mélange, la composition du sol, l'apport de nutriments, la présence de micro-organismes dégradeurs ainsi que la biodisponibilité du polluant peuvent tous affecter le rendement (Atlas et Cerniglia, 1995; Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1992; Morgan et Watkinson, 1989; Wilson et Jones, 1993). Il faut aussi s'assurer que le traitement ne générera pas des sous-produits plus toxiques que les polluants de départ (Shuttleworth et Cerniglia, 1995).

2.2.1 Traitement *In situ*

Les traitements *in situ* consistent à traiter sur place le sol contaminé lorsqu'il y a risque de contamination de la nappe phréatique, lorsqu'il est impossible d'excaver le sol pour effectuer le traitement ailleurs ou lorsque le volume à traiter est trop important. En optimisant les paramètres tels que l'oxygénation, l'apport de nutriments et l'humidité, il est possible d'augmenter la biodégradation des polluants par la microflore indigène du sol. Des micro-organismes spécifiquement adaptés peuvent aussi être injectés à l'intérieur de puits creusés sur le site contaminé si la microflore indigène ne possède pas les enzymes nécessaires pour dégrader les polluants (Samson, 1994a; Wilson et Jones,

1993). Ce genre de traitement est plus complexe que le traitement *ex-situ* puisqu'il nécessite la délimitation des zones de contamination, un profil de composition et de contamination du sol, la mise en place des infrastructures pour l'ajout de nutriments et l'oxygénation, ainsi qu'une caractérisation géologique et hydrologique complexe du site.

2.2.2 Traitement *Ex situ*

Lorsque l'excavation du sol est possible, le traitement *ex situ* peut être utilisé. Il permet le traitement de grands volumes de sol dans un environnement contrôlé soit en biopiles, par épandage contrôlé ou en bioréacteurs. Ce type de traitement permet d'optimiser l'apport d'humidité, le pH, les nutriments, l'aération et de maintenir une température optimale pour la biodégradation des contaminants. Cette technique permet aussi de bien brasser le sol contaminé pour s'assurer de l'homogénéité du traitement (Morgan et Watkinson, 1989; Samson, 1994b; Wilson et Jones, 1993).

3 Biodégradation des HAP

3.1 Généralités

Plusieurs revues bibliographiques très complètes sur la biodégradation des HAP ont été publiées dans les 10 dernières années (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1992, 1993; Cutright et Lee, 1994; Kanaly, 2000; Shuttleworth et Cerniglia, 1995). De nombreux micro-organismes capables de dégrader les HAP de faible poids moléculaire ont été isolés et étudiés en laboratoire, mais il y en a eu beaucoup moins pour les HAP de 4 cycles et plus. Pour diverses raisons comme une faible biodisponibilité causée par leur adsorption sur la matière organique du sol et leur faible solubilité dans l'eau, les HAP, surtout ceux ayant plus de 3 cycles aromatiques, persistent encore dans l'environnement (Cerniglia, 1993). Bien que les conditions environnementales telles que le type de sol, le taux d'humidité, la concentration des HAP, la toxicité du sol, la température, le pH, la présence d'accepteurs d'électrons, le pourcentage de matière organique ainsi que les propriétés physico-chimiques des molécules influencent largement le sort des HAP dans

l'environnement, sans la présence de micro-organismes capables de dégrader les HAP. aucune biodégradation ne peut être envisagée.

Les micro-organismes capables de dégrader les HAP légers appartiennent à des genres très variés et ont fait l'objet de recensements exhaustifs représentés dans le tableau 2 (Atlas et Cerniglia, 1995; Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1984, 1992, 1993; Cerniglia et Heitkamp, 1989; Cutright et Lee, 1994; Shuttleworth et Cerniglia, 1995). Parmi ces micro-organismes, les bactéries pouvant dégrader le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène ont été très bien documentées et les voies métaboliques ont été élucidées (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1984, 1992). Par contre, il y a peu d'information sur les micro-organismes pouvant dégrader des HAP lourds comme le chrysène et le benzo[a]pyrène lorsque présent comme seule source de carbone (Cerniglia, 1993; Kanaly, 2000). Ceci peut être visualisé dans le tableau 2 par le faible nombre de micro-organismes isolés capables de dégrader les HAP lourds par rapport à ceux pouvant dégrader les HAP légers.

Beaucoup moins étudiés que les bactéries, les champignons ont aussi la capacité de dégrader les HAP par l'action de peroxydases et de monooxygénases (tableau 2). Cependant, contrairement aux bactéries, les champignons n'utilisent pas les HAP comme seule source de carbone et d'énergie mais les co-métabolisent plutôt en sous produits plus facilement assimilables par les bactéries (Cerniglia *et al.*, 1992; Sutherland, 1992). Il est aussi généralement admis depuis les années 80 que certaines algues et cyanobactéries ont la capacité de dégrader les HAP et ont probablement une contribution majeure à la biodégradation des HAP dans les milieux aquatiques (Cerniglia, Sutherland et Crow, 1992).

3.2 Biodégradation des HAP par des souches bactériennes

3.2.1 Généralités

Ce fut en 1975 que des souches capables de dégrader des HAP de haut poids moléculaire furent isolées pour la première fois. Les premiers furent Gibson *et al.* (1975) qui avaient créé une souche mutante de *Beijerinckia* en l'exposant à du N-méthyl-N'-

nitro-N-nitrosoguanidine. Cette bactérie était capable de dégrader de faibles quantités de benzo[a]pyrène et de benz[a]anthracène par co-métabolisme après croissance sur du succinate et du biphenyle. La même année, Barnsley (1975) avait mis au point une méthode de chromatographie en phase gazeuse pour identifier des souches capables de dégrader le fluoranthène et le benzo[a]pyrène à des concentrations près de leur limite de solubilité dans l'eau (0,26 et 0,003 mg/L respectivement). Il a identifié plusieurs souches de *Pseudomonas* capables de co-métaboliser de faibles quantités de fluoranthène et de benzo[a]pyrène lorsqu'en présence de succinate.

Tableau 2 : Micro-organismes dégradant les HAP

HAP	Bactéries	Champignons
Anthracène (3 cycles)	<i>Arthrobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i>	<i>Bjerkandera</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Ramaria</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Trametes</i>
Phénanthrène (3 cycles)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Gordona</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Pleurotus</i> , <i>Trametes</i>
Fluoranthène (4 cycles)	<i>Alcaligenes</i> , <i>Gordona</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella</i>
Pyrène (4 cycles)	<i>Alcaligenes</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Pleurotus</i>
Chrysène (4 cycles)	<i>Rhodococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Sphingomonas</i> ,	<i>Cunninghamella</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Syncephalastrum</i>
Benz[a]anthracène (4 cycles)	<i>Alcaligenes</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Sphingomonas</i>	<i>Cunninghamella</i>
Benzo[a]pyrène (5 cycles)	<i>Beijerinckia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Sphingomonas</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Bjerkandera</i> , <i>Candida</i> , <i>Chrysosporium</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Mortierella</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Phanerochaete</i> , <i>Ramaria</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Trametes</i> , <i>Trichoderma</i>
Coronène (6 cycles)	<i>Burkholderia</i> , <i>Stenotrophomonas</i>	

Adapté de Cerniglia (1992) et Cerniglia *et al.* (1992)

Il a cependant fallu attendre la fin des années 80 pour que les connaissances sur la biodégradation des HAP lourds franchissent trois seuils importants. D'abord, Heitkamp et Cerniglia (1988a) ont été les premiers à isoler d'un sol contaminé aux hydrocarbures, un bâtonnet Gram positif, plus tard identifié comme la souche *Mycobacterium* sp. PYR-1, capable de dégrader de façon significative une série de HAP lourds. Ils ont démontré que la souche pouvait minéraliser 90% du fluoranthène et 60 % du pyrène présent après deux semaines d'incubation dans un milieu contenant d'autres sources de carbone. De plus, les vitesses de minéralisation observées étaient plus rapides que celles obtenues avec le phénanthrène (trois cycles) et le naphthalène (deux cycles).

Ensuite, la même année, Mahaffey *et al.* (1988) ont été les premiers à démontrer qu'il y avait ouverture du cycle aromatique lors de la biodégradation de HAP lourds en identifiant des intermédiaires de dégradation du benz[*a*]anthracène par résonance magnétique nucléaire. Leur résultats ont été obtenus par induction des voies de dégradation d'une souche de *Beijerinckia* (plus tard identifiée comme *Sphingomonas yanoikuyae*) avec du biphenyle, du m-xylène et du salicylate. Des expériences de minéralisation ont aussi démontré qu'il y avait dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ lors de la croissance de la souche en présence de ^{14}C -benz[*a*]anthracène.

Finalement, Mueller *et al.* (1989) ont montré pour la première fois que la dégradation du fluoranthène lorsque présent comme seule source de carbone était possible. Ils ont isolé un consortium de 7 souches à partir d'un sol contaminé au créosote par repiquages successifs dans un milieu minimal minéral avec fluoranthène. Lorsque le consortium a été inoculé dans un milieu contenant du fluoranthène (8,7 mg/L) ainsi qu'un mélange de 16 HAP typiquement retrouvés dans le créosote, dont le pyrène (2,3 mg/L), le benzo[*b*]fluorène (0,4 mg/L), le chrysène (0,3 mg/L) et le benzo[*a*]pyrène (1,2 mg/L), la totalité des HAP a été dégradée au bout de 3 jours dont 13 en dessous du seuil de détection (10 ng/L). Au bout de 14 jours, les seuls HAP restant étaient le fluoranthène (17 %) et le pyrène (12 %).

3.2.2 HAP à 4 cycles

3.2.2.1 Fluoranthène

Parmi les HAP à 4 cycles, plusieurs études ont été effectuées sur la capacité des bactéries à dégrader le fluoranthène, le pyrène, le chrysène et le benz[a]anthracène. L'isolement de souches pouvant dégrader le fluoranthène, un HAP de 4 cycles contenant un cycle à 5 carbones, a été démontré à plusieurs reprises et des voies métaboliques ont été proposées.

En 1990, deux articles ont été publiés par des groupes différents rapportant l'isolement d'une souche pure pouvant dégrader le fluoranthène comme seule source de carbone. Mueller *et al.* (1990) ont isolé la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 à partir du consortium de 7 souches isolées en 1989 (Mueller *et al.*, 1989). La souche EPA505 était aussi capable de dégrader d'autres HAP de 4 cycles comme le benzo[b]fluorène, le benz[a]anthracène, le chrysène et le pyrène dans des cultures contenant du fluoranthène.

Ensuite, Weissenfels *et al.* (1990) ont isolé la souche *Alcaligenes denitrificans* WW1 capable de dégrader 0,3 mg/mL par jour de fluoranthène et de co-métaboliser d'autres HAP tels que le pyrène et le benz[a]anthracène. Diverses analyses leur ont permis d'identifier quelques intermédiaires de dégradation et de proposer une voie de dégradation bactérienne pour le fluoranthène.

Des voies de dégradation pour le fluoranthène ont aussi été rapportées par Kelley et Cerniglia (1991) avec des études effectuées sur la souche *Mycobacterium* sp. PYR-1. Dans des milieux de cultures contenant d'autres sources de carbone, la souche PYR-1 pouvait dégrader jusqu'à 95 % de fluoranthène ajouté en 24 h. Cette souche pouvait aussi minéraliser jusqu'à 90 % de ¹⁴C-fluoranthène de même que plusieurs autres HAP légers. Lors d'ensemencements de sédiments contaminés avec la souche PYR-1, des augmentations significatives dans le taux de minéralisation du fluoranthène ont été obtenues et ce malgré la présence d'une microflore indigène.

Plus récemment, Willumsen *et al.* (1998) ont étudié l'effet des détergents Triton X-100 et Tween 80 sur les taux de minéralisation du fluoranthène par 4 souches bactériennes. Pour chacune des souches, les résultats ont varié mais avec la souche

Sphingomonas paucimobilis EPA505, ils sont parvenus à doubler les taux de minéralisation du fluoranthène dans des cultures contenant du Triton X-100 et du calcium. Barkay *et al.* (1999) ont aussi réussi à plus que doubler les taux de minéralisation du fluoranthène par la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 avec l'ajout du bioémulsifiant Alasan aux cultures.

3.2.2.2 Pyrène

Parmi les HAP à 4 cycles, le pyrène est celui qui a été le plus étudié et de nombreuses souches pouvant le dégrader ont été isolées et les voies métaboliques élucidées. Plusieurs groupes ont isolé des souches pouvant co-métaboliser le pyrène en présence de sources de carbone plus facilement assimilables (Heitkamp et Cerniglia, 1988a; Mueller *et al.*, 1989, 1990; Trezesicka-MLynarz et Ward, 1995; Wang *et al.*, 1990; Weissenfels *et al.*, 1990). La première isolée fut la souche *Mycobacterium* sp. PYR-1 capable de minéraliser 60 % du pyrène en culture pure avec suppléments de carbone (Heikamp *et al.*, 1988c). Dans des sédiments contaminés aux HAP et ensemencés avec la souche PYR-1, des augmentations significatives dans le taux de minéralisation du pyrène ont été observées. Des études de minéralisation avec des cultures induites et non-induites de la souche PYR-1 contenant du chloremphénicol (inhibiteur de la synthèse des protéines) ont révélé que les gènes de dégradation du pyrène étaient inductibles (15 % du pyrène a été minéralisé après 24 h pour la culture induite contre moins de 1 % après 72 h pour la culture non-induite). Des analyses par chromatographie liquide à haute pression, par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse ont permis d'identifier sept intermédiaires de dégradation du pyrène.

La souche *Mycobacterium* sp. RJGII-135 est la première souche pure à avoir été isolée et capable de croître sur le pyrène lorsque présent comme seule source de carbone (Grosser *et al.*, 1991). Elle pouvait aussi co-métaboliser le benz[*a*]anthracène en présence de pyrène et une introduction de la souche dans un sol contaminé a permis de minéraliser 55 % du ¹⁴C-pyrène par rapport à 1 % avec la microflore indigène seule.

Des voies de dégradation un peu plus complètes du pyrène ont été proposées par Cerniglia en 1992. Certains des intermédiaires clés de la dégradation du pyrène ont été confirmés plus tard par d'autres chercheurs avec des études sur la souche *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Schneider *et al.*, 1996), *Mycobacterium flavescens* (Deen-Ross et Cerniglia, 1996) et *Mycobacterium* sp. KR2 (Rehmann *et al.*, 1998).

Walter *et al.* (1991) ont isolé la souche *Rhodococcus* sp. UW1 qui pouvait dégrader 500 mg/L de pyrène et en minéraliser jusqu'à 72 % en 2 semaines. La souche pouvait aussi dégrader plusieurs autres HAP dont le chrysène, le benz[*a*]anthracène, le benzo[*a*]pyrène et le diben[*a,h*]anthracène par co-métabolisme en présence de pyrène.

Kästner *et al.* (1994) ont isolé, d'un sol contaminé aux hydrocarbures, les souches *Gordona* sp. BP9 et *Mycobacterium* sp. VF1, toutes deux capables de dégrader le fluoranthène et le pyrène comme seule source de carbone. La réintroduction dans le sol de la souche BP9, après croissance sur 200 mg/L de pyrène en culture pure, a causé une augmentation de six fois dans les quantités de pyrène dégradées par rapport au sol non inoculé.

Des taux de dégradation élevés du pyrène ont aussi été obtenus avec trois souches de *Burkholderia cepacia* isolées par Juhasz *et al.* (1996). Les souches VUN 10001, VUN 10002 et VUN 10003 (plus tard identifiée comme la souche *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10003 (Juhasz *et al.*, 2000)) ont été capables de dégrader entre 95-100 % des 250 mg/L de pyrène ajoutés aux cultures en 7-10 jours lorsque présent comme seule source de carbone. Des essais ont été effectués avec de plus fortes concentrations de pyrène (500 et 1000 mg/L) mais le pourcentage de pyrène dégradé a diminué au fur et à mesure que les concentrations initiales de pyrène en solution augmentaient. Toute dégradation dans les cultures a cessé une fois que 400 mg/L du pyrène initial étaient dégradés. Les trois souches ont aussi été en mesure de dégrader plusieurs autres HAP lourds lorsque préalablement enrichies sur du pyrène ou par co-métabolisme en présence de phénanthrène.

3.2.2.3 Benz[a]anthracène

Seulement quelques groupes ont réussi à isoler des souches capables d'utiliser le benz[a]anthracène comme seule source de carbone et d'énergie (Caldini *et al.*, 1995; Chen et Aitken, 1999; Juhasz *et al.*, 1997b). Comme mentionné précédemment, ce fut Gibson *et al.* (1975) qui ont été les premiers à démontrer la capacité de la souche *Beijerinckia* sp. B-836 à co-métaboliser le benz[a]anthracène en présence de succinate et de biphényle. Ensuite, Mahaffey *et al.* (1988) ont isolé une *Sphingomonas* capable de minéraliser le ¹⁴C-benz[a]anthracène en présence d'inducteurs des voies de dégradation des HAP (biphényle, m-xylène, salicylate).

En 1990, deux groupes ont isolé des souches pouvant dégrader le fluoranthène comme seule source de carbone et de co-métaboliser plusieurs autres HAP dont le benz[a]anthracène (Mueller *et al.*, 1990; Weissenfels *et al.*, 1990). En 1991, la souche *Rhodococcus* sp. UW1 isolée par Walter *et al.* pouvait dégrader 16 mg/L (8 %) de benz[a]anthracène par co-métabolisme lorsqu'en présence de pyrène. Schneider *et al.* (1996) ont aussi isolé une souche de *Mycobacterium* capable de dégrader plusieurs HAP dont le benz[a]anthracène, le pyrène et le benzo[a]pyrène dans un milieu contenant d'autres sources de carbone. Des études effectuées par Ye *et al.* (1996) sur la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 ont révélé que la souche pouvait dégrader plusieurs HAP lourds dont 7,29 mg/L de benz[a]anthracène après 16 h lorsque présent comme seule source de carbone.

Trois souches de *Burkholderia cepacia*, VUN 10001, VUN 10002 et VUN 10003, capable de dégrader des HAP lourds ont été isolées par Juhasz *et al.* (1996). Ils ont obtenu des faibles taux de dégradation du benz[a]anthracène de 6 % avec la souche VUN 10001 et de 9,5 % avec la souche VUN 10003 après 21 jours lorsque présent comme la seule source de carbone (50 mg/L). Il est cependant important de noter que les souches étaient préalablement cultivées sur du pyrène avant d'être inoculées aux cultures. De plus, des inoculum élevés ont été utilisés pour ensemercer les cultures afin d'augmenter les taux de dégradation des HAP ce qui laisse croire que la dégradation observée serait plutôt due à l'effet d'induction du pyrène qu'à une capacité réelle de dégrader ou de croître sur du benz[a]anthracène lorsque présent comme seule source de carbone.

Chen *et al.* (1999) ont aussi réussi à obtenir de faible taux de dégradation du benz[a]anthracène avec la souche *Pseudomonas saccharophilia* P15. Ils ont obtenu des taux de minéralisation de 10 % après 48 h lorsque le benz[a]anthracène était présent comme seule source de carbone. Des taux de minéralisation de 36 et 41 % respectivement ont été obtenus lorsque les cultures étaient induites avec du phénanthrène ou du salicylate.

3.2.2.4 Chrysène

Ye *et al.* (1996) ont démontré que la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 pouvait minéraliser 42 % de ^{14}C -chrysène en 48 h par co-métabolisme lorsqu'en présence de fluoranthène. D'autres études effectuées sur la même souche ont montré qu'elle pouvait aussi dégrader jusqu'à 3,15 mg/L de chrysène en 16 h lorsque présent comme seule source de carbone après préculture de la souche sur du fluoranthène.

Walter *et al.* (1991) ont isolé la souche *Rhodococcus* sp. UW1 par croissance sur du pyrène qui pouvait dégrader 100 mg/L de chrysène en 2 semaines par co-métabolisme en présence de pyrène.

Caldini *et al.* (1995) ont isolé une souche de *Pseudomonas fluorescens* à partir d'un sol contaminé aux hydrocarbures en inoculant les micro-organismes indigènes sur des géloses contenant du chrysène. Lorsque la souche a été inoculée dans des cultures liquides contenant du chrysène et de l'acétonitrile, un solvant organique miscible à l'eau et utilisé pour augmenter la solubilité des HAP, ils ont obtenu une dégradation de 0,64 mg/L de chrysène après 8 jours d'incubation avec une augmentation du compte bactérien. Cependant, les cultures contenaient aussi 0,25 mg/L de peptone, d'extrait de levures et d'amidon comme sources additionnelles de carbone. De plus, lors de l'analyse des cultures après éclatement des cellules, ils ont démontré qu'il y avait une forte concentration intracellulaire de chrysène. Il est possible que la disparition du chrysène observé dans le milieu de culture ne soit qu'un cas d'accumulation intracellulaire du chrysène et non une dégradation comme le suggère les auteurs. À la limite, il s'agit d'un cas de co-métabolisme du chrysène en présence de sources de carbone plus facilement assimilable.

Chen *et al.* (1999) ont démontré que la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 pouvait minéraliser 15 % du chrysène lorsque présent comme seule source de carbone. De plus, des tests d'induction ont démontré que lorsque la culture était préalablement induite par croissance sur du phénanthrène ou du salicylate, que 45 et 47 % du chrysène respectivement étaient minéralisés.

A ce jour, les connaissances sur la dégradation microbienne du chrysène sont assez limitées puisque très peu de souches pouvant dégrader de fortes doses de chrysène comme seule source de carbone ont été isolées. De plus, aucun intermédiaire de dégradation du chrysène n'a encore été identifié.

3.2.3 HAP de 5 cycles et plus

Les souches *Burkholderia cepacia* VUN 10001, 10002 et 10003 ont été isolées par Juhasz *et al.* (1996) et sont parmi les seules à pouvoir dégrader des quantités significatives de HAP ayant de 5 à 6 cycles aromatiques dont le coronène (Juhasz *et al.*, 1996, 1997a, 1997b). Ces souches ont été isolées d'un terrain contaminé aux HAP à l'aide de cultures en séries avec le pyrène comme seule source de carbone. Lorsque préalablement enrichies sur du pyrène et en utilisant un inoculum élevé, les trois souches ont dégradé 65 à 70 % du coronène présent (20 mg/L) après 63 jours. Les souches VUN 10002 et 10003 ont aussi dégradé le dibenz[*a,h*]anthracène après préculture sur du pyrène dont jusqu'à 12 mg/L (23 %) pour la souche VUN 10003 au bout de 56 jours avec de faibles augmentations de protéines bactériennes. En présence de 100 mg/L de phénanthrène, les trois souches ont été capables de dégrader le dibenz[*a,h*]anthracène et de benzo[*a*]pyrène. La souche VUN 10001 a dégradé 26 mg/L (52 %) de dibenz[*a,h*]anthracène et 20,5 mg/L (41 %) de benzo[*a*]pyrène après 56 jours tandis que les souches VUN 10002 et 10003 ont dégradé ces HAP avec des proportions variant entre 30 et 49 %.

Ye *et al.* (1996) ont démontré la capacité de la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505, isolée par Mueller *et al.* (1990), à dégrader plusieurs HAP lourds. Avant d'être ajoutée aux cultures, la souche EPA505 était préalablement cultivée sur du fluoranthène et puis étalée sur pétris d'agarose contenant 0,4 g/L de glucose pour obtenir

des bactéries en phase de croissance logarithmique. Les bactéries étaient ensuite récupérées, lavées et puis ressuspendues dans du tampon phosphate avant d'être ajoutées aux milieux contenant les HAP. Après 16 h d'incubation ils ont obtenu une dégradation de 3,3 mg/L pour le benzo[a]pyrène, 1,2 mg/L pour le benzo[b]fluoranthène et 0,78 mg/L pour le dibenz[a,h]anthracène lorsque présent comme seule source de carbone.

D'autres groupes comme (Gibson *et al.*, 1975; Grosser *et al.*, 1991; Mueller *et al.*, 1989, 1990) ont aussi démontré la capacité de souches ou de consortiums bactériens à dégrader le benzo[a]pyrène dans des cultures lorsque d'autres sources de carbones sont présentes.

3.3 Biodégradation des HAP par des champignons

La dégradation par les champignons des HAP ayant plus de trois cycles aromatiques a été beaucoup moins étudiée que la dégradation bactérienne. Malgré cela, plusieurs revues assez complètes des écrits scientifiques ont été publiées sur le sujet (Cerniglia, 1984, 1993; Cerniglia *et al.*, 1992; Cerniglia et Heitkamp, 1989; Sutherland, 1992; Wilson et Jones, 1993).

Contrairement aux bactéries, les champignons n'utilisent pas les HAP comme source de carbone et d'énergie mais vont plutôt les détoxifier par co-métabolisme à l'aide de ligninases et de monooxygénases en dérivés hydrosolubles plus facilement assimilables par les bactéries. Les études les plus complètes ont été effectuées avec les champignons de la pourriture blanche tels que *Phanerochaete chrysosporium* (Barclay *et al.*, 1995; Brodkorb et Legge, 1992; Bumpus, 1989), *Pleurotus ostreatus* (Bezalel *et al.*, 1996; Vyas *et al.*, 1994) et *Trametes versicolor* (Anderson et Henrysson, 1996; Collins *et al.*, 1996; Vyas *et al.*, 1994). À l'aide de la production de ligninases extracellulaires, ces champignons sont capables entre autre de dégrader certains HAP à cinq cycles et de détoxifier les sols et les sédiments contaminés aux HAP. Par exemple, des études effectuées en laboratoire avec la souche *Phanerochaete chrysosporium* ont démontré qu'elle pouvait oxyder au moins 22 HAP de deux, trois ou quatre cycles dont l'anthracène, le pyrène, le pérylène, le benz[a]anthracène et le benzo[a]pyrène après 27 jours lorsque cultivée dans des conditions limitantes en nutriments, ce qui démontre bien la faible spécificité des enzymes impliquées (Bumpus, 1989). Sanglard *et al.* (1986) ont

aussi montré que *Phanerochaete chrysosporium* pouvait minéraliser 19 % du ^{14}C -benzo[a]pyrène en $^{14}\text{CO}_2$ et en eau lorsque cultivé avec du glucose dans des conditions limitantes en azote.

Les champignons non lignolytiques comme *Cunninghamella elegans*, *Penicillium janthinellum* et *Syncephalastrum* sp. peuvent aussi métaboliser une variété de HAP dont le pyrène, le chrysène et le benzo[a]pyrène en composés moins toxiques et plus facilement assimilables par les bactéries (Kiehlmann *et al.*, 1996; Lauren *et al.*, 1995; Pothuluri *et al.*, 1994; Wunder *et al.*, 1997).

Un exemple de coopération entre champignons et bactéries pour la dégradation des HAP lourds a été démontré par Boonchan *et al.* (2000) lors de tests effectués avec la souche *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10010, le consortium bactérien VUN 10009 et le champignon *Penicillium janthinellum* VUO 10201, tous isolés de différents sols contaminés. Ils ont montré que le consortium bactérien VUN 10009 ainsi que la souche *S. maltophilia* VUN 10010 pouvaient dégrader 250 mg/L de pyrène après 56 jours et entre 6 et 12 % de chrysène, benz[a]anthracène, benzo[a]pyrène et de dibenz[a,h]anthracène (50 mg/L) lorsque chaque HAP était présent comme seule source de carbone dans un milieu minimal minéral. Lorsque le pyrène était ajouté aux cultures, des taux de dégradation de 10 à 32 % respectivement ont été observés pour les divers HAP. Le champignon *P. janthinellum* VUO 10201 était incapable de croître ou de dégrader les HAP lorsqu'ils étaient présents comme seule source de carbone mais pouvait les co-métaboliser lorsque placés dans un milieu plus riche. Lorsque des co-cultures champignons-bactéries ont été préparées, 16 et 25 % du ^{14}C -benzo[a]pyrène respectivement ont été minéralisés en $^{14}\text{CO}_2$ après 49 jours avec les co-cultures constituées de *P. janthinellum* et du consortium bactérien ainsi qu'avec les co-cultures de *P. janthinellum* et de *S. maltophilia*. Aucune minéralisation n'a été observée lorsque chacun d'eux était seul en culture. Des augmentations de la dégradation entre 9 et 40 % ont aussi été observées pour les divers HAP avec les cultures champignon-bactéries avec une augmentation de 2 log des comptes bactériens et de 50 à 70 % du poids sec des champignons après 56 jours.

L'inoculation de co-cultures dans un sol contaminé a aussi permis d'obtenir une augmentation significative dans la minéralisation du benzo[a]pyrène (53 % du ^{14}C -

benzo[*a*]pyrène ajoutés à un sol contaminé ont été récupérés sous forme de $^{14}\text{CO}_2$ après 100 jours) accompagnée d'une réduction de la toxicité du sol par rapport aux essais effectués avec les cultures individuelles.

3.4 Voies métaboliques

Il existe trois principales voies de dégradation aérobies des HAP, celle impliquant une attaque initiale par une monooxygénase, par une dioxygénase ou par une peroxydase (figure 2). Pour la plupart des bactéries ainsi que quelques algues vertes, la dégradation des HAP se fait à l'aide de dioxygénases avec introduction de deux groupes hydroxylés pour former un catéchol. Une fois le composé aromatique hydroxylé, il y a soit ouverture du cycle en position 1,2 (ortho) à l'aide d'une pyrocatechase ou en position 2,3 (méta) à l'aide d'une métapyrocatechase. Une fois ouvert, le restant du cycle est oxydé et il y a ouverture du prochain cycle selon le même mécanisme (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia *et al.*, 1992, 1994; Sutherland *et al.*, 1995). Plusieurs études complètes sur les voies métaboliques des HAP légers comme le naphthalène, l'anthracène et le phénanthrène ont été publiées avec l'identification des mécanismes enzymatiques et de la régulation génétique. Les voies de dégradation des HAP lourds sont cependant encore très peu connues. A part le pyrène pour lequel les voies métaboliques de dégradation et les mécanismes enzymatiques ont été partiellement élucidés (Heitkamp *et al.*, 1988b, 1988c; Walter *et al.*, 1991), très peu est connu sur les voies de dégradation du benz[*a*]anthracène et du benzo[*a*]pyrène et encore moins sur le chrysène (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1993; Sutherland *et al.*, 1995).

L'utilisation des monooxygénases du cytochrome P-450 pour attaquer les HAP avec formation de trans-dihydrodiols est la voie principalement utilisée par les mammifères, les champignons non-ligninolytiques et quelques algues pour détoxifier et éliminer les xénobiotiques. Il s'agit d'un système à plusieurs composants souvent associé à la membrane cellulaire et avec un large spectre d'action contrairement aux dioxygénases qui ont plutôt une spécificité de substrat étroite envers une famille de composés (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia, 1993; Sutherland *et al.*, 1995). Les micro-organismes qui utilisent cette voie pour dégrader les HAP ne peuvent les utiliser comme

seule source de carbone et nécessitent la présence d'autres sources d'énergie plus facilement assimilables.

Les champignons de la pourriture blanche sont les seuls à utiliser des ligninases pour dégrader les HAP. Étant très peu spécifiques, ces enzymes permettent à des champignons poussant sur d'autres sources de carbone de dégrader de nombreux polluants comme les HAP. Les ligninases s'attaquent aux cycles aromatiques des HAP en y ajoutant deux atomes d'oxygènes pour former des quinones ce qui mène ultérieurement à l'ouverture du cycle aromatique.

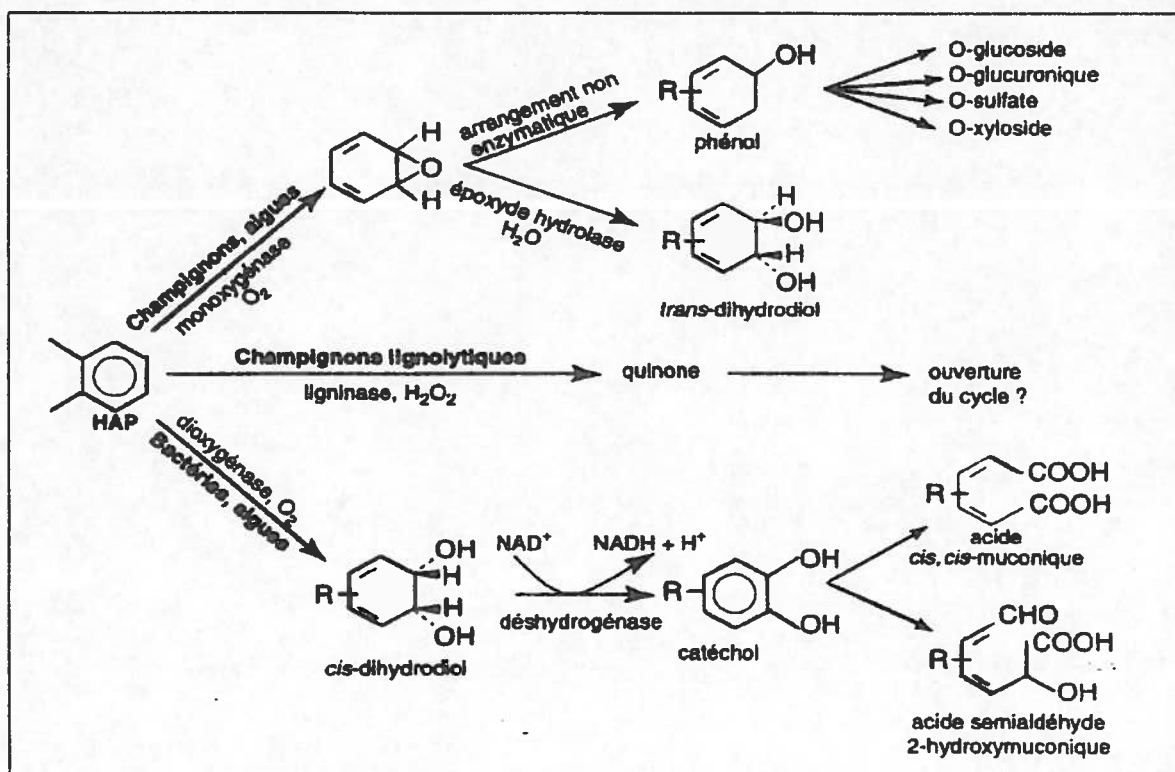


Figure 2 : Mécanismes de dégradation des HAP (Bouchez *et al.*, 1996b)

4 Augmentation de la biodisponibilité des HAP

La faible biodisponibilité des HAP lourds est l'une des raisons principales expliquant les faibles taux de dégradation observés dans l'environnement et la difficulté à isoler des souches bactériennes pouvant croître sur ces derniers lorsque présent comme seule source de carbone. Dans le but d'augmenter la biodisponibilité des HAP en cultures liquides, plusieurs méthodes comme l'utilisation de meilleures techniques de brassage, l'ajout de surfactants naturels ou synthétiques, l'ajout de solvants organiques miscibles à l'eau et l'ajout de solvants hydrophobes non miscibles ont été essayés (Déziel *et al.*, 1999).

Il y a deux façon d'augmenter la biodisponibilité d'un composé solide, soit en améliorant son taux de transfert de masse vers la phase aqueuse ou en augmentant sa solubilité. Une méthode couramment utilisée pour améliorer le taux de transfert de masse est d'augmenter la surface de contact entre le substrat et la phase aqueuse à l'aide d'agitations mécaniques.

Une autre méthode pour améliorer la biodisponibilité d'un composé est par l'ajout d'agents tensioactifs comme les surfactants. Beaucoup d'articles ont été publiés depuis quelques années sur l'utilisation de surfactants pour augmenter la biodisponibilité des HAP (Déziel *et al.*, 1996; Grimberg *et al.*, 1994; Jimenez et Bartha, 1996; Providenti *et al.*, 1995; Thibault *et al.*, 1996; Tsomides *et al.*, 1995; Volkering *et al.*, 1995). Les surfactants sont des molécules amphiphiles constituées de deux pôles, un hydrophobe et l'autre polaire qui peuvent être d'origine synthétique ou biologique. L'ajout de surfactants permet de réduire la tension superficielle et d'augmenter la solubilisation, l'émulsion et la dispersion d'un composé hydrophobe peu soluble. Cependant, plusieurs problèmes reliés à l'utilisation de surfactants ont été identifiés comme leur toxicité envers les micro-organismes et la séquestration des composés à l'intérieur des micelles de surfactant.

D'autres études ont été effectuées sur l'utilisation de solvants miscibles à l'eau pour augmenter la solubilité des HAP. Ces méthodes ont permis d'augmenter significativement les taux de dégradation des HAP lourds pour certaines souches déjà connues pour leur capacité de dégradation de ces composés (Caldini *et al.*, 1995; Jimenez et Bartha, 1996). Malgré la publication de résultats positifs, l'ajout de solvants à des

milieux de cultures reste problématique à cause de leur toxicité envers la majorité des micro-organismes à des concentrations supérieures à 0,1 % (v/v) (Inoue et Horikoshi, 1991; Vermue *et al.*, 1993).

Une méthode beaucoup plus prometteuse pour augmenter la biodégradation et favoriser l'isolement de micro-organismes capables de dégrader des composés peu solubles et/ou toxiques comme les HAP lourds a été suggérée par certains auteurs (Ascon-Cabrera et Lebeault, 1993; Boethling, 1984; Collins et Daugulis, 1997a, 1997b; Köhler *et al.*, 1994; Rezessy-Szabo *et al.*, 1987; Vanneck *et al.*, 1995; Villemur *et al.*, 2000). Elle consiste à ajouter un solvant hydrophobe non miscible à l'eau, qui ne sert pas de source de carbone et qui est non toxique pour les micro-organismes. Les cultures qui en résultent contiennent donc deux phases liquides, une phase aqueuse dans laquelle les micro-organismes vont croître et une phase hydrophobe contenant le composé insoluble. Le composé insoluble et/ou toxique va donc diffuser dans le milieu aqueux selon son coefficient de partition et sera ensuite dégradé par les micro-organismes. Cette technique a été utilisée avec succès par Ascon-Cabrera et Lebeault (1993) pour isoler plusieurs micro-organismes pouvant dégrader le 1,2 dichlorobenzène et le 1,2,3-trichlorobenzène. Ils y sont parvenus en utilisant des cultures biphasiques contenant 20 % (v/v) d'huile de silicone comme phase hydrophobe non biodégradable dans laquelle les composés étaient dissous. Les cultures étaient agitées constamment afin d'augmenter la surface de contact entre l'huile et la phase aqueuse, favorisant ainsi le transfert de masse et permettant d'améliorer le taux de biodégradation. Un système très semblable utilisant l'huile de silicone pour augmenter la biodégradation d'un mélange de 5 HAP a aussi été utilisé avec succès par Vanneck *et al.* (1995) et démontre bien le potentiel de cette technique pour l'isolement et l'étude de souche pouvant dégrader les HAP lourds.

Des cultures biphasiques avec huile de silicone ont aussi été utilisées par Gardin *et al.* (1999) pour dégrader jusqu'à 10 g/L d'un mélange de xylène et d'acétate de butyle. Ils ont obtenu une dégradation globale des deux composés de 63 mg/L par heure à l'aide d'un consortium de 7 souches. Sans l'utilisation de cultures biphasiques, avec la phase hydrophobe servant de réservoir pour les composés xénobiotiques, une concentration aussi élevée aurait été toxique pour les micro-organismes présents dans le milieu.

Des bioréacteurs à deux phases liquides ont aussi été utilisés par certains groupes pour dégrader des polluants industriels comme le phénol (Collins et Daugulis, 1997a, 1997b; Cruickshank *et al.*, 2000a, 2000b), le benzène, le toluène et le *p*-xylène (Collins et Daugulis, 1999a, 1999b). Villemur *et al.* (2000) ont quant à eux utilisé des bioréacteurs à deux phases liquides pour augmenter la dégradation des HAP lourds dans le sol. Ceci leur a permis d'enrichir un consortium bactérien à partir d'un sol contaminé au créosote et d'obtenir de bons taux de dégradation pour le pyrène (19 mg/L par jour), le chrysène (3,5 mg/L par jour) et le benzo[*a*]pyrène (0,94 mg/L par jour) par rapport aux bioréacteurs à une seule phase liquide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Isolement d'une souche bactérienne dégradant le chrysène

1.1 Flore indigène de la sablière Thouin

Le sol utilisé comme source de micro-organismes a été prélevé à la sablière Thouin. Celle-ci est située à l'Assomption dans la région de Montréal et fut utilisée entre 1966 et 1968 pour éliminer divers déchets industriels, dont des boues huileuses, des résidus de chaux, des barils de graisse et divers matériaux de construction. Les contaminants identifiés sur le site appartiennent principalement à la famille des hydrocarbures, dont une forte concentration de HAP. Le mélange de sol utilisé au cours de ces travaux provenait d'un échantillonnage, effectué en juillet 1993, de plusieurs emplacements sur le site de la sablière Thouin. Nommé R20-27, il avait été entreposé à 4°C en absence de lumière pour minimiser tout changement dans la microflore indigène. C'est de ce mélange que provenaient les micro-organismes utilisés pour ensemercer les cultures initiales.

Pour préparer les cultures initiales, deux fois 500 g de sol de la sablière ont été pesés et ajoutés séparément à deux bouteilles de 1 litre contenant chacun 200 mL de milieu minimal minéral Bushnell-Hass (BH) (0,2 g/L de sulfate de magnésium, 0,02 g/L de chlorure de calcium, 1 g/L de phosphate de monopotassium, 1 g/L de phosphate d'ammonium, 1 g/L de nitrate de potassium et 0,05 g/L de chlorure de fer) (Difco, Detroit, MI). Les bouteilles ont été agitées vigoureusement pendant 20 minutes puis elles ont été laissées au repos pendant 5 minutes afin que le sol puisse sédimenter. Les surnageants contenant les micro-organismes provenant du sol ont été récupérés et centrifugés à $800 \times g$ pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les particules de sol résiduelles. Les surnageants ont ensuite été récupérés ensemble et centrifugés à $18500 \times g$ pendant 10 minutes à 4°C. Les micro-organismes sédimentés ont été lavés avec du milieu BH et puis centrifugés de nouveau à $18500 \times g$. Le culot a été récupéré dans 25 mL de milieu BH afin d'obtenir une forte concentration de micro-organismes. Les milieux de culture biphasiques (voir section 1.2.1) ont étéensemencés avec 2.5 mL de cet inoculum (5 % (v/v)).

1.2 Techniques d'isolement

1.2.1 Milieux de culture biphasiques

Des cultures biphasiques, composées d'une phase hydrophobe (huile de silicone) et d'une phase aqueuse (milieu minimal minéral), ont été utilisées pour sélectionner les bactéries responsables de la dégradation du chrysène. Pour ce faire, des volumes de 50 mL de milieu minimal minéral BH ont été ajoutés à deux fioles de 500 mL. Ensuite 10 mL de diméthylpolysiloxane (huile de silicone) ayant une viscosité de 20 centistokes (Sigma, St-Louis, MO) et contenant 60 mg de chrysène (Aldrich, Milwaukee, WI) par litre d'huile ont été ajoutés à chaque fiole. Une quantité de 3 g de sol de surface non-contaminé, prélevé sur un terrain résidentiel dans la région de Montréal, a aussi été ajoutée aux cultures biphasiques. Les milieux de culture ont ensuite été stérilisés à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C avant d'êtreensemencés avec un volume de 0.5 mL d'une suspension de la microflore de la sablière Thouin. Les deux cultures ont été placées à 31°C et agitées à une vitesse de 200 rpm dans un incubateur, modèle G-53 (New Brunswick Scientific, New Brunswick, NJ).

1.2.2 Repiquages et dilutions

La diversité microbienne retrouvée dans un échantillon de sol étant très élevée, des repiquages successifs en milieux frais accompagnés de fortes dilutions ont été effectués. Le chrysène étant la seule source de carbone dans ces cultures à l'exception de la faible quantité de matière organique présente dans les 3 g de sol ajoutés, cette façon de faire avait pour but d'éliminer les bactéries indigènes de la sablière Thouin qui ne pouvaient dégrader le chrysène. Pour tous les repiquages, la culture avec le taux de dégradation du chrysène le plus élevé a été utilisée pour inoculer la prochaine série de cultures. Donc, après deux semaines d'incubation, des volumes de 0.5 mL ont été prélevés de l'une des cultures biphasiques inoculées avec la microflore indigène de la sablière contaminée. Ceux-ci ont servi à inoculer deux cultures biphasiques fraîches qui à leur tour servaient, après deux semaines d'incubation, à inoculer deux autres cultures fraîches. Après trois repiquages dans ces conditions des séries de dilutions ont été effectuées à partir de ces cultures. Les dilutions ont été effectuées en prélevant un

volume de 0,5 mL de l'une des cultures dans une éprouvette contenant 4,5 mL de milieu BH stérile. Après une agitation vigoureuse, un volume de 0,5 mL a été prélevé et ajouté à une autre éprouvette contenant elle aussi 4,5 mL de milieu BH stérile. Cette procédure a été effectuée jusqu'à un facteur de dilution de 10^{-6} . Des volumes de 0,5 mL de la culture originale et des dilutions 10^{-3} à 10^{-6} ont été inoculés dans de nouvelles cultures biphasiques et ces dernières ont été incubées à 31°C tel que décrit auparavant.

Suite aux analyses, la culture ayant étéensemencée avec l'inoculum le plus dilué, mais qui présentait une activité de biodégradation du chrysène, a été diluée et repiquée de nouveau tel que décrit plus haut. Ces repiquages en série avec dilutions allant de 10^{-3} à 10^{-6} ont été effectués une dizaine de fois, après quoi deux autres repiquages avec une dilution de 10^{-9} ont été effectués.

1.2.3 Cultures sur gélose

Afin d'isoler une souche pure dégradant le chrysène, des étalements sur gélose R2A (BBL, Cockeysville, MD) ont été effectués à partir des cultures biphasiques ayant étéensemencées avec l'inoculum le plus dilué et présentant toujours une activité de biodégradation du chrysène. Un échantillon de 0,5 mL de la phase aqueuse de ces cultures a été ajouté à 4,5 mL de milieu BH et dilué plusieurs fois comme décrit plus haut. Des échantillons de 0,1 mL de ces dilutions (10^{-1} à 10^{-6}) ont ensuite été étalés sur gélose R2A et incubés à température de la pièce pendant une semaine. Les colonies ainsi isolées ont alors été repiquées 3 fois sur gélose R2A pour s'assurer de leur pureté avant d'être utilisées pour ensemencer des milieux de culture biphasiques frais. Cette méthode a permis d'isoler deux souches pures, l'une formant des colonies oranges et l'autre des colonies jaunes. Des cultures biphasiquesensemencées avec ces colonies ont montré que seul les colonies oranges pouvaient dégrader le chrysène. La souche pure ainsi isolée fut nommée souche ML1.

2 Conservation de la souche ML1

Afin de conserver la souche ML1 et d'empêcher que le phénotype de cette dernière change avec le temps, la souche a été lyophilisée. Pour ce faire, la biomasse de trois géloses R2A a été récupérée après 5 jours d'incubation à température de la pièce et ajoutée à 10 mL d'une solution de lait écrémé 1 % (p/v) stérile. Ensuite, cette solution a été répartie par volume de 0,5 mL dans des ampoules à lyophilisation. Ces ampoules ont été congelées rapidement en les plaçant dans un récipient contenant du glycérol et de la glace sèche. Une fois congelées, les ampoules ont été placées sur l'appareil à lyophilisation, jusqu'à ce que toute l'eau présente dans les ampoules, sous forme de glace, se soit sublimée. Une fois la lyophilisation terminée, les tubes ont été scellés hermétiquement en faisant fondre le verre à l'embouchure des tubes.

Des tubes congelés ont ensuite été préparés à partir d'une ampoule lyophilisée en transférant le contenu dans 70 mL de milieu R2A stérile. Après deux jours d'incubation à 29°C, 30 mL de glycérol ont été ajoutés à la culture avant de la répartir dans des tubes de 10 mL. Ces tubes ont été congelés à -70°C et ont servi d'inoculum de départ pour les différentes expériences effectuées avec la souche ML1.

3 Identification

3.1 Séquençage de gène de l'ARNr 16S

L'ADN de la souche ML1 a été extrait en suspendant une colonie de la souche ML1 dans un micro-tube de 1,5 mL contenant 300 µL de tampon TEN (Tris HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM) et en la plaçant dans de l'eau bouillante pendant 5 min. Le tube a ensuite été refroidi sur glace et centrifugé à $16000 \times g$ pendant 5 min à 25°C. Le surnageant, contenant l'ADN de la souche ML1, a été récupéré et conservé au congélateur à -20°C jusqu'à son utilisation comme matériel de départ pour amplifier le gène de l'ARNr 16S.

La réaction d'amplification par PCR a été effectuée dans un volume de 52 µL composé de 50 µL du « cocktail » [40,5 µL d'eau déionisée stérile, 5 µL de tampon polymérase 10 × (Pharmacia, Baie-d'Urfé, Que), 1 µL de chacun des amorces universelles pA et pH (10 pmol/µL) correspondant respectivement aux nucléotides 8 à 27

et 1541 à 1522 de la séquence du gène de l'ARNr 16S d'*E. coli* (Dagher *et al.*, 1997), 1 μ L de dNTP (200 pmol/ μ L), 1 μ L de BSA (« Bovine Serum Albumin ») (100 μ g/mL), 0,5 μ L de polymérase (5 U/ μ L)] et de 2 μ L de l'ADN de la souche ML1 (environ 50 à 100 ng). Le mélange était protégé de l'évaporation par ajout en surface de 30 μ L d'huile minérale stérile. Les conditions du PCR sur l'appareil DNA Thermal Cyclor 480 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) ont été les suivantes : 3 min à 80°C pendant lesquelles l'ADN de la souche ML1 était ajouté (« hot start »), 5 min à 94°C, 5 min à 55°C suivi de 35 cycles de 2 min à 72°C, 40 sec à 94°C, 1 min à 55°C et finalement 1 cycle de 10 min à 72°C.

Une fois la réaction terminée, les deux tubes à PCR ont été combinés dans un micro-tube de 1,5 mL et le volume complété à 200 μ L avec de l'eau stérile. L'ADN a été purifié par extraction avec 1 vol. de phénol/chloroforme/isoamyl (50:49:1) suivi d'une extraction avec 1 vol. de chloroforme/isoamyl (24:1). Après récupération de la phase aqueuse, l'ADN a été précipité en ajoutant 1/10 vol. d'ammonium acétate 3 M (AcNH_4) et 2 vol. d'éthanol 95 % suivi d'une incubation de 12 h à -20°C et d'une centrifugation de 20 min à 16000 $\times g$ et à 25°C. Le surnageant a été vidangé et le culot lavé avec 500 μ L d'éthanol 70 % et resuspendu dans 10 μ L d'eau déionisée stérile (Sambrook *et al.*, 1989). Une migration par électrophorèse sur gel d'agarose de 1 % (p/v) à 82 volts pendant 1 heure a été effectuée pour s'assurer de la présence d'un unique fragment d'ADN de 1,5 Kb.

Le fragment d'ADN a par la suite été ligué au vecteur pGEM®-T (Promega, Madison, WI) en ajoutant 2 μ L de l'ADN à un micro-tube contenant 1 μ L du tampon « T4 DNA Ligase », 1 μ L du vecteur pGEM®-T, 1 μ L de « T4 DNA Ligase » et 5 μ L d'eau déionisée. Le tout a été bien mélangé et incubé pendant 12 h à 4°C. Le produit de ligation a ensuite été transformé dans la souche *E. coli* XL1-bleu (Bullock *et al.*, 1987) par la méthode au chlorure de calcium (Sambrook *et al.*, 1989). Une fois la transformation terminée, un volume de 200 μ L a été incubé sous agitation à 37°C pendant 45 min dans une fiole contenant 800 μ L de milieu SOC (20 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extract, 0,5 g/L de NaCl, glucose 10 mM). Les transformants ont été étalés sur du milieu SOB solide (20 g/L bacto-tryptone, 5 g/L bacto-yeast extract, 0,5 g/L de NaCl, agar 1,5 % p/v) contenant les produits de sélection appropriés (ampicilline 100 mg/L, X-Gal 40 mg/L et IPTG 400 mg/L) et incubés pendant 16 h à 37°C. Une

construction contenant le vecteur pGEM®-T avec l'insert donnera des colonies blanches tandis qu'une construction avec le vecteur seul sans l'insert donnera des colonies bleues.

Une dizaine de colonies blanches ont été sélectionnées à partir du Pétri et ont été repiquées dans des tubes stériles contenant 2 mL de milieu SOC suivi d'une incubation sous agitation de 12 heures à 37°C. Trois tubes avec une forte croissance ont été sélectionnés et l'ADN a été extrait selon la méthode phénol/chloroforme/isoamyl décrite précédemment. L'ADN prélevé dans la phase aqueuse (200 µL) a été précipité par ajout de 50 µL de AcNH₄ 10N et 2 vol. d'éthanol 95 % suivi d'une incubation de 15 minutes au congélateur (-20°C) et d'une centrifugation de 10 min à 16000 × g et à 25°C. Le culot restant a été lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % et resuspendu dans 50 µL de RNase 10 µg/mL. L'ADN a été migré sur gel d'agarose 1% (p/v) afin de s'assurer de la présence de l'insert de 1,5 Kb.

Après vérification de la présence de l'insert de 1,5 Kb dans les transformants, une culture a été effectuée dans 5 mL de milieu SOB avec ampicilline (100 µg/mL). Les transformants ont été incubés sous agitation pendant 12 h à 37°C après quoi le contenu a été récupéré pour une purification plasmidique sur colonne QIAprep (Quiagen, Mississauga, Ontario). Le matériel utilisé ainsi que le protocole ont été fournis par le manufacturier. Après purification, l'ADN plasmidique a été resuspendu dans 10 µL d'eau et sa concentration calculée par D.O.₂₆₀₋₂₈₀ avant d'être envoyé au service de séquençage.

L'ADN a été séquencé sur un appareil ABI Prism 377 à l'aide du kit de séquençage « BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit » (PE Applied Biosystems, Mississauga, Ontario). Une quantité de 1 µg d'ADN double brin a été utilisée pour chaque réaction. Les amorces 533R (5' TTACCGCGGC(AG)GCTGGCAC 3'), Sp6 (5' ATTTAGGTGACGACACTATA 3'), T7 (5' CCCTATAGTGAGTCGTATTA 3'), R6 (5' CCGTCAATTCATTTGAGTTT 3') et R9 (5' CATTGTAGCACGTGTGTA 3') ont été utilisées pour les réactions de séquençage. Les séquences ont été analysées et corrigées à l'aide de logiciel Chromas version 1.42 (« School of Biomolecular and Biomedical Science », Brisbane, Australie) et puis les divers séquences ont été alignées et placées bout à bout pour obtenir la séquence total du gène de l'ARNr 16S de la souche

ML1. La séquence a par la suite été déposée dans GenBank (# d'accès AY026948) et soumise pour analyse à l'aide du programme BLAST.

3.2 Analyses biochimiques

Afin de confirmer l'identité de la souche ML1 et pour la caractériser d'avantage, des tests biochimiques ont été effectués. Les galeries API 20 et 20-E (bioMérieux, St-Laurent, Que) ont été utilisées pour ces tests. Les colonies de la souche ML1 utilisées pour ensemercer les galeries provenaient d'une culture sur gélose R2A de 5 jours incubée à la température de la pièce. Les galeries ont ensuite été incubées pendant 11 jours dans l'obscurité à la température de la pièce après quoi les lectures ont été effectuées. Les résultats ont été analysés à l'aide d'un logiciel d'interprétation de données APILAB PLUS version 3.2.2 (bioMérieux).

3.3 Présence de gènes de dégradation des HAP

3.3.1 Préparation de l'ADN génomique

Un volume de 1 mL d'une culture de 3 jours de la souche ML1 en milieu R2A a été prélevé et centrifugé à $3000 \times g$ pendant 5 min à 25°C. Le culot a été resuspendu dans 1 mL de tampon TEN avec 5 mg de lysozyme frais et incubé 10 min à 37°C. Ensuite, 100 µL de SDS 20 % (p/v), 10 µL de β -mercaptoéthanol ainsi que 100 µg de protéinase K préalablement dissout dans 100 µL de TEN ont été ajoutés. L'ADN a été purifié à l'aide de trois extractions consécutives, la première avec 1 vol. de phénol suivi d'une extraction au phénol/chloroforme/isoamyl (25:24:1, v/v) et d'une extraction au chloroforme/alcool isoamyl (24:1, v/v) (Sambrook *et al.*, 1989). Ensuite, 2 µL de RNase 10 µg/mL ont été ajoutés à la phase aqueuse et le tout a été incubé 15 min à 37°C. Deux volumes d'éthanol 95 % (v/v) ainsi que 50 µL de AcNH_4 10 N ont été ajoutés et le micro-tube a été centrifugé à $6000 \times g$ pendant 10 min à 25°C pour faire précipiter l'ADN. Le culot a ensuite été lavé avec 500 µL d'éthanol 70 % et ressuspendu dans 100 µL d'eau. La concentration de l'ADN a été calculée en mesurant la D.O. à 260-280 nm.

3.3.2 Réaction de PCR

Deux séries de réaction d'amplification par PCR ont été effectuées selon la même méthode mentionnée précédemment (voir section 3.1). l'une en utilisant une température d'appariement des amorces de 55°C et l'autre avec une température de 50°C. Les réactions de PCR avec température d'appariement des amorces de 55°C ont été effectuées seulement avec l'ADN de la souche ML1 tandis que ceux avec une température d'appariement de 50°C ont été effectuées avec l'ADN de la souche ML1 et celui d'un témoin positif, l'ADN de la souche *Sphingomonas* sp. 19R. Les amorces universelles pA et pH ainsi que les paires d'amorces Diox G et Diox D, Fer Bam H et Fer Eco et Isp avec Red (Dagher *et al.*, 1997) des gènes codants pour la voie catabolique supérieure du naphthalène et retrouvés dans les opérons *nah*, *dox* et *nah* ont été utilisées pour les réactions. Les produits de la réaction ont ensuite été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose de 1% (p/v) à 82 volts pendant 1 heure.

4 Conditions de culture standard

4.1 Préparation de l'inoculum

Une fois que la souche ML1 a été isolée, lyophilisée et puis congelée, toutes les expériences subséquentes d'identification et de caractérisation ont été effectuées à partir des tubes congelés de la souche ML1. Ces derniers ont été utilisés pour ensemer des bouteilles de 250 mL contenant 50 mL de milieu R2A liquide stérile (24 mg/L de magnésium sulfate, 0,25 g/L de tryptone, 0,3 g/L de potassium phosphate dibasique, 0.5 g/L d'extrait de levures, de dextrose et d'amidon, 0,75 g/L de peptone, 0,24 mL d'acide pyruvique, p.H 7,2 ± 0,2) . Les bouteilles ont été incubées à 31°C pendant 2 jours sous agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,3 à 600 nm. Ces cultures en milieu R2A ont par la suite servi à ensemer les divers milieux de culture utilisés.

4.2 Cultures biphasiques

L'huile de silicone utilisée dans les cultures biphasiques a été préparée en ajoutant 30 mg de chrysène à 500 mL d'huile de silicone. L'huile a ensuite été placée dans un incubateur à 70°C pendant une heure et mélangée dans un bain à ultrasons (Cole-Parmer,

L'extraction du chrysène a été effectuée en ajoutant 50 mL d'acétate d'éthyle et en agitant vigoureusement pendant 5 min. Le tube a par la suite été centrifugé 5 min à 5000 rpm et l'acétate d'éthyle a été prélevé et transféré dans un ballon de 100 mL. Cette procédure a été répétée deux autres fois avec 40 mL d'acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention d'un volume de 100 mL d'acétate d'éthyle dans le ballon. Une fois l'extraction complétée, 4 mL d'acétate d'éthyle contenu dans ballon ont été prélevés et évaporés à 70°C dans un tube conique. Après l'évaporation, le chrysène a été resolubilisé dans 2 mL de DMF et 0,5 mL de ce dernier a été prélevé et mélangé à 0,5 mL d'acétonitrile contenant 0,2 % (v/v) d'acide acétique. Le chrysène présent a ensuite été analysé par HPLC (section 9.1.1).

5 Spectre de dégradation des HAP

5.1 HAP seuls

Afin de déterminer la capacité de la souche ML1 à dégrader des HAP autres que le chrysène, plusieurs cultures biphasiques ont été préparées en remplaçant le chrysène par divers HAP. Les cultures ont été préparées, incubées et analysées de la même façon décrite pour les cultures biphasiques standards mais en substituant le chrysène pour d'autres HAP. Les HAP testés étaient l'anthracène, le phénanthrène, le fluoranthène, la benz[a]anthracène, le pyrène, le benzo[a]pyrène, le pérylène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le dibenz[a,h]anthracène et le coronène (Aldrich). La concentration initiale du dibenz[a,h]anthracène, du pérylène et du coronène dans l'huile était de 30 mg/L tandis que la concentration des autres HAP dans l'huile était de 60 mg/L.

5.2 Chrysène avec autres HAP

Afin de vérifier si la présence de chrysène dans les cultures biphasiques pouvait influencer la dégradation des autres HAP, des cultures biphasiques ont été préparées en parallèle avec celles mentionnées plus haut contenant à la fois du chrysène ainsi que les HAP respectifs. La concentration initiale du chrysène dans l'huile de silicone était de 60

mg/L et la concentration initiale des autres HAP était la même que lorsque ces derniers étaient seuls dans le milieu.

5.3 Minéralisation

Des expériences de minéralisation ont été effectuées avec la souche ML1 afin de vérifier si la biodégradation du chrysène observée dans les cultures biphasiques était complète (chrysène $\rightarrow$ CO₂ + H₂O + biomasse). Ces expériences ont été effectuées dans des bouteilles sérologiques de 100 mL ayant reçu un compte de 45 000 désintégrations par minutes (dpm) par bouteille de [5,6,11,12-¹⁴C]-chrysène (ChemSyn, Lenexa, KA). Ces bouteilles ont été placées sous une hotte chimique pendant 1 heure afin que le solvant ayant contenu le chrysène marqué puisse s'évaporer. Une fois le solvant évaporé, 35 mL de milieu BH, 1,5 g de sol ainsi que 10 mL d'huile de silicone contenant 60 mg/L de chrysène ont été ajoutés. Une éprouvette de 5 mL a été placée dans chaque bouteille de façon à ce qu'elle repose à l'intérieur de la bouteille sans se renverser. Les bouteilles ont ensuite été scellées hermétiquement à l'aide de bouchons de Téflon avant d'être stérilisées. Une fois stériles, les milieux ont étéensemencés avec 0,5 mL d'une culture de la souche ML1 et 1 mL d'une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 1 % (p/v) a été placé dans les éprouvettes pour capter le CO₂. Ces cultures ont été incubées en absence de lumière, à la température de la pièce et ont été agitées constamment à 200 rpm dans un appareil New Brunswick modèle G-25 (New Brunswick Scientific).

Les prélèvements de KOH ont été effectués à intervalles réguliers à l'aide d'aiguilles et de seringues. Tout le KOH de l'éprouvette (1 mL) a été transféré dans une fiole à scintillation. Un volume égal de KOH frais (1 % (p/v)) a été ajouté à l'éprouvette pour la rincer complètement. Ce volume a ensuite été combiné au premier dans la fiole à scintillation. Finalement, 1 mL de KOH frais (1 % (p/v)) ainsi que de l'oxygène (6 lb/po²) ont été ajoutés au tube et dans la bouteille, respectivement. L'ajout d'oxygène permet d'éviter que ce paramètre devienne un facteur limitant pour la croissance bactérienne. Un volume de 5 mL de liquide à scintillation Ultima Gold XR (Packard Instruments, Meriden, CT) a été ajouté au KOH prélevé. La fiole à scintillation a ensuite été agitée vigoureusement puis le comptage effectué. La radioactivité a été déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation modèle LS 1701 (Beckman, Fullerton, CA) suivant le

programme de comptage de ^{14}C . Les valeurs obtenues ont été exprimées en désintégrations par minute (dpm).

Des cultures en bouteilles sérologiques de 100 mL, en absence de chrysène marqué, ont aussi été préparées en parallèle et incubées dans les mêmes conditions. Ces cultures ont servi à suivre les taux de dégradation du chrysène au HPLC par rapport au chrysène minéralisé.

6 Importance du sol pour la dégradation du chrysène

Des cultures préliminaires effectuées pendant l'isolement de la souche ML1 ont révélé l'importance du sol dans les milieux de culture biphasiques pour obtenir des taux élevés de dégradation du chrysène. Ayant réussi à isoler une souche pure, des études ont été entreprises pour essayer d'identifier le facteur présent dans le sol qui serait responsable des meilleurs taux de dégradation observés.

6.1 Confirmation de l'importance du sol

Afin de quantifier l'importance du sol pour la dégradation du chrysène, des cultures biphasiques contenant 3 g de sol ont été préparées en parallèle avec d'autres cultures sans sol. Des cultures ont aussi été préparées en remplaçant le sol par 3 g de sol pyrolysé. Ce sol a été chauffé à 550°C pendant 24 heures afin d'éliminer toute trace de matière organique. Ces cultures servaient à vérifier si les minéraux présents dans le sol pouvaient améliorer les taux de dégradation du chrysène.

6.2 Extrait aqueux de sol

Des extraits aqueux du sol ont été effectués dans le but de simplifier les milieux de culture biphasiques en éliminant la présence du sol. Les extraits ont été préparés en faisant bouillir 300 g de sol dans un litre d'eau pendant 30 minutes et en le stérilisant à l'autoclave pendant 1 heure à 121°C. Une fois refroidi, l'extrait a été centrifugé à 18 500 $\times g$ pendant 20 minutes à 25°C pour faire sédimenter les fines particules de sol en suspension et le surnageant a été filtré sur un papier-filtre Whatman 5 (Whatman,

Maidstone, Kent). Un volume de 10 mL de l'extrait aqueux de sol a ensuite été ajouté à la place du sol aux cultures biphasiques.

6.3 Activation de la souche ML1 avec un extrait aqueux de sol.

Cet essai a été réalisé afin de vérifier si le sol agissait comme inducteur de la voie de dégradation du chrysène. L'activation de la souche ML1 a été effectuée à partir d'une culture standard de la souche ML1 en milieu R2A liquide. Après 2 jours d'incubation, la culture a été centrifugée à $18\,500 \times g$ pendant 10 min à 25°C afin de faire sédimenter les bactéries. Le culot a alors été remis en suspension dans une bouteille contenant 20 mL de milieu minimal minéral BH et 10 mL d'un extrait aqueux de sol. La suspension cellulaire a ensuite été placée sur un incubateur rotatif pendant 4 heures à 25°C. Une fois l'incubation terminée, elle a été de nouveau centrifugée à $18\,500 \times g$ pendant 10 min à 25°C et le culots lavé avec 5 mL de milieu BH frais. Le culot a été centrifugé et lavé une deuxième fois avant d'être ajouté à des cultures biphasiques sans sol.

6.4 Extraits de sol avec solvants

Lors de ces expériences, des extractions de la matière organique présente dans le sol ont été effectuées avec de l'acétate d'éthyle et de l'hexane à partir d'un extrait aqueux de sol. Le but était d'identifier si les fractions organiques extraites par ces solvants pouvaient activer la dégradation du chrysène. Un volume de 250 mL d'extrait aqueux a d'abord été acidifié jusqu'à un pH inférieur à 3, avec de l'acide chlorhydrique. Ensuite, deux extraits ont été effectués avec 100 mL d'hexane chaque fois, en brassant vigoureusement les tubes sur un agitateur. Les tubes ont été centrifugés à $10\,000 \times g$ pendant 5 minutes à 4°C et le solvant récupéré. Par la suite, deux autres extraits ont été effectués avec 100 mL chacun d'acétate d'éthyle selon la même méthode. L'hexane récupéré ainsi que l'acétate d'éthyle ont chacun été évaporés sur un évaporateur rotatif et les extraits ont été resolubilisés dans 150 mL d'eau chacun. Des cultures biphasiques ont ensuite été préparées avec ces extraits en ajoutant 20 mL de l'extrait à l'hexane à trois cultures biphasiques contenant 50 mL de milieu BH ainsi que 20 mL d'huile. D'autres séries de cultures biphasiques ont été préparées en ajoutant 20 mL de l'extrait à l'acétate d'éthyle à des fioles contenant 50 mL de milieu BH et 20 mL d'huile. Une série de trois

cultures a aussi été préparée en combinant 10 mL de chacun des extraits avec 50 mL de BH et 20 mL d'huile. Des cultures biphasiques ont été préparées contenant 20 mL de l'extrait de sol épuisé (phase aqueuse restant après les extractions avec les divers solvants) avec 50 mL de BH et 20 mL d'huile. Des témoins positifs, contenant un extrait aqueux de sol (voir section 6.2) ont aussi été préparés.

6.5 Extraits de sol avec charbon activé

Une stratégie d'extraction sur phase solide a aussi été utilisée. Pour ce faire, 20 g de charbon activé (20-40 mesh, granulaire) (Aldrich) ont été ajoutés à 200 mL d'un extrait aqueux de sol et le mélange a été agité vigoureusement pendant 18 heures sur une plaque magnétique. Une fois sédimenté, le surnageant a été filtré sur un filtre Whatman 5 et conservé. Le charbon a par la suite été placé dans un incubateur à 70°C pendant 2 heures. Une fois séché, le charbon a été lavé pendant 2 heures, sous agitation avec 120 mL de méthanol.

Des cultures biphasiques ont été préparées en ajoutant 30 mL de l'extrait de sol épuisé (extrait aqueux de sol restant après l'adsorption de sa matière organique sur le charbon activé) avec 40 mL de milieu BH. Une autre série a été préparée en évaporant 30 mL de l'extrait au méthanol dans une fiole avant d'y ajouter 70 mL de milieu BH.

6.6 Analyse de l'extrait aqueux par HPLC et par spectrométrie de masse

Ces tests ont été effectués pour identifier le facteur du sol responsable pour l'augmentation de la vitesse de dégradation du chrysène observée suite aux expériences précédentes. Pour ce faire, 200 mL d'un extrait de sol ont été agités pendant 12 h en présence de 20 g de charbon activé. Le charbon a été récupéré et lavé avec 120 mL de méthanol pendant 5 h. Le méthanol a par la suite été transféré dans deux ampoules et évaporé sous vide. La matière organique contenue dans chacune des ampoules a été pesée et puis resolubilisée dans 2 mL d'acétonitrile pour les analyses au HPLC. Pour les analyses par chromatographie en phase gazeuse couplé à un spectre de masse (GC-MS), l'extrait de méthanol a été solubilisé dans un mélange de 0,25 mL de BSTFA (Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) (Supelco, Bellefonte, PA) et 1,75 mL d'acétonitrile. Un volume de 50 µL de ce mélange a été ajouté à une fiole contenant 25 µL de BSTFA et

175 μ L d'acétonitrile. La fiole a par la suite été scellée et incubée à 70°C pendant 30 minutes et l'échantillon injecté au GC-MS

Afin de s'assurer que les pics observées au HPLC ne provenait pas du charbon activé, des témoins abiotiques ont été préparés en agitant le charbon avec 200 mL d'eau pendant 12 h, suivi d'un lavage du charbon avec 120 mL de méthanol pendant 5 h. Le méthanol a par la suite été évaporé dans des ampoules sous vide et les dépôts restants ont été pesés. Les témoins abiotiques ont ensuite été resolubilisés dans les mêmes volumes que les fractions organiques pour analyse au HPLC et au GC-MS.

6.7 Remplacement du sol par d'autres matières organiques

Des cultures biphasiques ont été préparées en remplaçant le sol par des composées organiques que l'on y retrouve. Les tests ont été effectués avec des acides humiques, de la lignine hydrolitique, et des acides résiniques. Les cultures avec des acides résiniques ont été préparées comme des cultures biphasiques standards en remplaçant le sol par 0,3 mg d'acide abietic et d'acide palustic (Helix Biotech Corporation). Pour les milieux de culture avec ajout d'acides humiques, ceux-ci ont été préparés comme des cultures biphasiques sans sol avec ajout de deux concentrations différentes d'acides humiques. Une série a été préparée avec ajout de 10 mg d'acides humiques (Aldrich) par fiole et une autre série a été préparée avec ajout de 50 mg d'acides humiques. D'autres cultures ont été préparées avec ajout de 10 et 50 mg de lignine hydrolitique (Aldrich).

6.8 Remplacement du sol par des vitamines et des minéraux

Des cultures biphasiques ont été effectuées en remplaçant le sol par 5 mL d'une solution de minéraux en trace et 5 mL d'une solution de vitamines. La solution de minéraux en trace a été préparée en ajoutant à un litre d'eau 0,1 g de chacun des éléments suivants : MnCl_2 , ZnCl_2 , CoCl_2 , H_3BO_3 et Na_2MoO_4 . La solution de vitamines a été préparée dans un litre d'eau en ajoutant 0,1 mg de vitamine B_{12} , 2 mg de biotine, 2 mg d'acide folique, 5 mg des éléments suivants : riboflavine, thiamine, acide nicotinique, acide panthothénique, acide thiotique et acide p-aminobenzoic, ainsi que 10 mg de pyridoxine. Les solutions ont été stérilisées par filtration sur une membrane de 0,2 μm de porosité (Millipore, Bedford, MA) et ajoutées aux cultures après stérilisation.

6.9 Cultures biphasiques en milieu plus riche

Pour vérifier l'effet d'un milieu de culture plus riche sur la vitesse de dégradation du chrysène, des cultures biphasiques ont été effectuées en substituant le milieu BH par du milieu R2A. Une première série de cultures a été préparée dans des bouteilles de 250 mL en ajoutant 50 mL de milieu R2A liquide, 10 mL de milieu BH ainsi que 20 mL d'huile de silicone contenant 60 mg/L de chrysène. Dans la deuxième série, 10 mL d'extrait aqueux de sol ont été ajoutés à la place du milieu BH pour vérifier l'effet du sol sur la vitesse de dégradation du chrysène dans un milieu plus riche. Des témoins abiotiques composés de 50 mL de milieu R2A, 10 mL de milieu BH ainsi que 20 mL d'huile de silicone ont aussi été préparés.

7 Courbe de croissance

Pour effectuer la courbe de croissance de la souche ML1 en culture biphasique, une culture activée en présence de sol a été utilisée (voir section 6.3). Avant d'être ajouté aux milieux de cultures, le culot de la souche ML1 activée a été suspendu dans 6 mL de tampon-phosphate salin (PBS) et dilué par un facteur de 10^4 . Puisque les cultures biphasiques ont été effectuées en absence de sol ou d'extrait de sol, la seule source de carbone présente dans les milieux était le chrysène. La courbe de croissance a été effectuée en prélevant des échantillons de 0,1 mL de la phase aqueuse à intervalles réguliers et en effectuant une série de dilutions dans des tubes coniques contenant 0,9 mL de PBS. Les cultures ont été effectuées en triplicata de même que chacun des prélèvements. Des étalements sur gélose R2A ont été effectués à partir des dilutions et, après 5 jours d'incubation à température de la pièce, les comptes bactériens ont été effectués. La densité de la population bactérienne a été obtenue en effectuant la moyenne des 9 dénombrements (3 fioles avec 3 prélèvements par fiole) pour chacun des intervalles de temps.

8 Identification des intermédiaires de dégradation du chrysène

8.1 Analyse de cultures monophasiques

Les premiers essais pour identifier les intermédiaires de dégradation ont été effectués à l'aide de cultures monophasiques. Les cultures ont été préparées dans des fioles de 500 mL contenant 3 g de sol, 70 mL de milieu BH et 11 mg de chrysène. Une fois stérilisées, les cultures ont été inoculées avec 3 mL d'une culture en milieu R2A de la souche ML1 et incubées sous agitation à 31°C pendant 20 jours. Des cultures abiotiques non inoculées ont été préparées en parallèle dans les mêmes conditions.

L'extraction des intermédiaires de dégradation a été effectuée en milieu acide, dans des tubes de polypropylène (Beckman, Mississauga, Ont). Les milieux ont été acidifiés jusqu'à un pH inférieur à 3 avec l'ajout d'acide chlorhydrique. Les intermédiaires ont été extraits deux fois avec 80 mL d'éther en mélangeant vigoureusement le contenu des tubes sur un agitateur pendant 5 min. Les tubes ont été centrifugés à $10000 \times g$ pendant 5 min à 4°C et l'éther récupéré. Les deux extraits à l'éther ont été combinés et évaporés sur un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un volume final de 10 mL. Un volume de 50 μ L d'éther a été prélevé et transféré dans une fiole à GC contenant 100 μ L de BSTFA. La fiole a été scellée et incubée pendant 10 minutes à 70°C avant d'être analysée par GC-MS.

8.2 Analyse de cultures biphasiques

Des essais pour identifier les intermédiaires de dégradation du chrysène ont aussi été effectués en milieux de culture biphasiques sans sol (70 mL de milieu BH + 20 mL d'huile). Une culture de la souche ML1 activée en présence de sol (voir section 6.3) a été utilisée pour inoculer les milieux de cultures. Des témoins abiotiques ont été préparés de la même façon et inoculés avec la souche ML1 avant d'être stérilisés. Les cultures biotiques et abiotiques ont été effectuées en quadruple. Après 10 jours d'incubation, la concentration de chrysène dans chacune des cultures a été analysée au HPLC afin de s'assurer qu'il y a eu dégradation et les phases aqueuses respectives ont été récupérées ensemble dans des ampoules à décantation.

Afin d'enlever toute trace d'huile de silicone résiduelle, quatre extractions ont été effectuées en milieu basique avec un pH supérieur à 9; deux extractions avec 50 mL

d'éther et deux autres avec 50 mL d'acétate d'éthyle. Pour chacune des extractions, les ampoules ont été brassées vigoureusement pendant une minute, et les solvants ont été jetés. Une fois l'huile enlevée, les phases aqueuses ont été acidifiées jusqu'à un pH inférieur à 3 en ajoutant de l'acide chlorhydrique. Ensuite, huit extractions ont été effectuées, avec quatre solvants différents. Deux extractions ont été effectuées avec 50 mL d'éther, suivi de deux extractions avec 50 mL d'acétate d'éthyle, de deux autres avec 50 mL de dichlorométhane, et de deux extractions avec 50 mL de chloroforme. Tous les extraits en milieu acide ont été récupérés ensemble et puis évaporés sur un évaporateur rotatif. Une fois les solvants évaporés, l'extrait a été resolubilisé dans 2 mL d'acétonitrile. Un volume de 1 mL a été réservé pour une analyse par HPLC et par LC-MS. L'acétonitrile restant a été évaporé et resolubilisé dans 1,75 mL d'acétonitrile et 0,25 mL de BSTFA. Un volume de 150 μ L de cette suspension a ensuite été ajouté à une fiole contenant 50 μ L de BSTFA. La fiole a été scellée, incubée à 70°C pendant 30 min et puis son contenu injecté au GC-MS

9 Analyses chimiques

9.1 HPLC

9.1.1 Analyse des HAP

Les HAP extraits des diverses cultures ont été analysés par HPLC. La colonne utilisée était de type « phase inverse » Nova Pack C₁₈ (3.9 mm x 150 mm) (Waters Corporation, Milford, MA). Le contrôleur (600 Controller), la pompe (600 Pump), le détecteur (486 Tunable Absorbance Detector), ainsi que l'échantillonneur automatique (717plus automatic injector) sont de la compagnie Waters. Ces appareils étaient contrôlés par un ordinateur régi par le logiciel Millénium (version 2,15). La phase mobile était constituée d'eau et d'acétonitrile contenant 0,1 % (v/v) d'acide acétique. Tous les HAP, à l'exception du coronène ont été séparés par un gradient linéaire allant de 65 % d'acétonitrile et 35 % d'eau au départ et augmentant progressivement pendant 8 min à un débit de 2 mL/min jusqu'à 85 % d'acétonitrile et 15 % d'eau. Après ce délai, la concentration d'acétonitrile revenait rapidement à 65 % et se maintenait à ce niveau

pendant 2 minutes afin de rééquilibrer la colonne et de rétablir les conditions de départ entre chaque injection. L'absorbance était mesurée à la sortie de la colonne à une longueur d'onde de 254 nm.

Le coronène a été séparé à l'aide d'un gradient linéaire de 10 minutes allant de 75 % d'acétonitrile et 25 % d'eau au départ à 95 % d'acétonitrile et 5 % d'eau suivi d'un plateau de 2 min. Ensuite, la concentration d'acétonitrile et d'eau revenait rapidement à 75 et 25 % respectivement et se maintenait à ce niveau pendant 4 minutes afin de rééquilibrer la colonne et de rétablir les conditions de départ entre chaque injection. L'absorbance du coronène était quant à elle mesurée à une longueur d'onde de 300 nm.

Afin de pouvoir quantifier les HAP, des courbes standards ont été effectuées pour chacun des HAP utilisés. Ces standards ont été préparés en ajoutant des concentrations précises de HAP (0, 5, 10, 25, 50, 100 ppm) dans de l'acétonitrile et en l'injectant au HPLC selon le programme d'analyse des HAP mentionné plus haut. Ces courbes ont ensuite été utilisées par le logiciel Millénium pour déterminer la concentration des HAP présents dans les divers échantillons prélevés.

9.1.2 Analyse des intermédiaires de dégradation et des éléments du sol favorables à la dégradation du chrysène

Ces analyses ont été effectuées avec un gradient linéaire allant de 10 % d'acétonitrile et 90 % d'eau au départ et augmentant progressivement pendant 25 minutes à un débit de 2 mL/min jusqu'à 100 % d'acétonitrile suivi d'un plateau de 3 minutes. Après ce délai, la concentration d'acétonitrile revenait rapidement à 10 % et se maintenait à ce niveau pendant 2 minutes afin de rééquilibrer la colonne et de rétablir les conditions de départ entre chaque injection. La longueur d'onde utilisée pour détecter les composés inconnus était de 254 nm.

9.2 GC-MS

Les analyses au GC-MS ont été effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse de modèle Varian 3500 couplé à un spectromètre de masse Ion Trap 800 (Finnigan, USA). La colonne était de type HP-5 Trace Analysis (30 m × 0,25 mm × 0,25

μm) (Hewlett-Packard, Arondale, PA) et le gaz porteur était l'hélium. Le débit à la tête de la colonne était de 2,4 mL/min et la pression de 24,7 PSI. Un échantillon de 1 μL a été injecté à l'aide d'un injecteur automatique modèle Varian 8200cx. La température de l'injecteur était de 250°C et la température de la ligne de transfert était de 270°C. Le four a été programmé pour débiter avec une température initiale de 70°C pendant une minute suivi de 4 augmentations par gradient d'une durée totale de 22 minutes (5°C/min jusqu'à 115°C, 10°C/min jusqu'à 175°C, 20°C/min jusqu'à 300°C, et 30°C/min jusqu'à 310°C) et d'un plateau final de 4 minutes à 310°C.

9.3 LC-MS

Des analyses par chromatographie liquide couplées à un spectre de masse ont été effectuées avec un HPLC de modèle HP série 1100 (Hewlett Packard). La colonne utilisée était de type « Hypersilods, 5 μm » (4.0 $\times$ 125 mm) (Hewlett Packard). Le spectre de masse utilisé était de modèle « Quatro II » (Micromass, Altrincham, UK). Un volume de 100 μL de l'échantillon d'acétonitrile réservé pour l'analyse par LC-MS (section 8.2) a été injecté au HPLC avec un gradient linéaire allant de 10 % d'acétonitrile et 90 % d'eau au départ et augmentant progressivement pendant 25 minutes à un débit de 2 mL/min jusqu'à 100 % d'acétonitrile suivi d'un plateau de 2 minutes. Après ce délai, la concentration d'acétonitrile revenait rapidement à 10 % et se maintenait à ce niveau pendant 3 minutes afin de rééquilibrer la colonne et de rétablir les conditions de départ entre chaque injection. La longueur d'onde utilisée pour détecter les composés inconnus était de 254 nm. L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée en mode d'ionisation electrospray positif avec un balayage allant de 135 à 750 u.a. (unités atomiques). Le cône était à 35 volts et l'extracteur à 7 volts avec une température à la source de l'appareil de 120°C.

RÉSULTATS

1 Identification de la souche ML1

1.1 Caractéristiques biochimiques de la souche ML1

L'analyse du profil biochimique de la souche ML1, obtenu à l'aide des tests effectués sur galerie API 20 NE (tableau 3) a permis de l'identifier comme étant une *Sphingomonas paucimobilis* avec 99.9% d'homologie. Les deux tests à l'encontre de cette identification étaient l'assimilation du mannose (assimilation dans 75% des cas) et l'assimilation de l'adipate (assimilation dans seulement 3% des cas).

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques de la souche ML1

Caractéristiques ^a	Résultats ^b	Caractéristiques ^a	Résultats ^b
NO₃ (réduction)	-	Mannose (ass)	-
TRP (formation d'indole)	-	N-acétyl-gluc (ass)	-
Glucose (fermentation)	-	Maltose (ass)	+
ADH (arginine dihydrolase)	-	Gluconate (ass)	(+)
URE (uréase)	-	Caprate (ass)	-
Esculine (hydrolyse)	+	Adipate (ass)	(+)
GEL (hydrolyse)	-	Malate (ass)	(+)
PNPG (β-galactosidase)	+	Citrate (ass)	-
Glucose (ass)	+	Phényl-acétate (ass)	-
Arabinose (ass)	+	Oxidase (cytochrome-oxidase)	+

^a Tests biochimiques effectués sur galerie API 20NE

^b +, positif; -, négatif; (+), faiblement positif
(ass) = assimilation

1.2 Séquençage du gène de l'ARNr 16S

Le meilleur alignement de la séquence du gène de l'ARNr 16S a été obtenu avec la souche *Sphingomonas* sp. DhA-95 avec 96% d'homologie. Des dix séquences ayant données les meilleures alignements, neuf appartiennent à des souches du genre *Sphingomonas* (tableau 4) dont six d'entre elles ont soit été isolées de sols contaminés

aux hydrocarbures ou ont la capacité de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Tableau 4 : Homologies avec le gène de l'ARNr 16S de la souche ML1

Espèce	Numéro d'accès (GenBank)	Homologie avec la souche ML1	Origine
<i>Sphingomonas</i> sp. DhA-95	AF177917	96%	Obtenu dans l'Arctique d'un sol contaminé aux hydrocarbures, dégrade les acides résiniques
<i>Pseudomonas abikonensis</i> IAM 12404T	AB021416	96%	
<i>Sphingomonas</i> sp. K74	AJ009709	96%	Dégrade le chlorophénol
<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC3990	AB025530	96%	Dégrade les HAP
<i>Sphingomonas</i> sp. UN1F1	U37345	96%	Dégrade les HAP
<i>Sphingomonas</i> sp. Ant17	AF184222	96%	Isolé d'un sol dans l'Antarctique. dégrade les HAP
<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC3992	AB025572	95%	Dégrade les HAP
<i>Sphingomonas</i> sp. JS5	AF157490	95%	Dégrade le 2-méthylphénanthrène
<i>Sphingomonas</i> sp. BRW2	AF025350	95%	Dégrade le dicamba
<i>Sphingomonas</i> sp. MBIC3020	AB025279	95%	Dégrade les HAP

2 Cultures biphasiques vs monophasiques

La comparaison des vitesses de dégradation du chrysène entre les milieux de culture biphasiques et monophasiques a révélé que la souche ML1 pouvait dégrader le chrysène beaucoup plus rapidement en cultures biphasiques (figure 3). Les taux de dégradation du chrysène étaient plus de trois fois plus rapides en cultures biphasiques qu'en cultures monophasiques. De légères baisses ont été obtenues dans les cultures abiotiques mais celles-ci ont été jugées non significative à cause la faiblesse des variations observées.

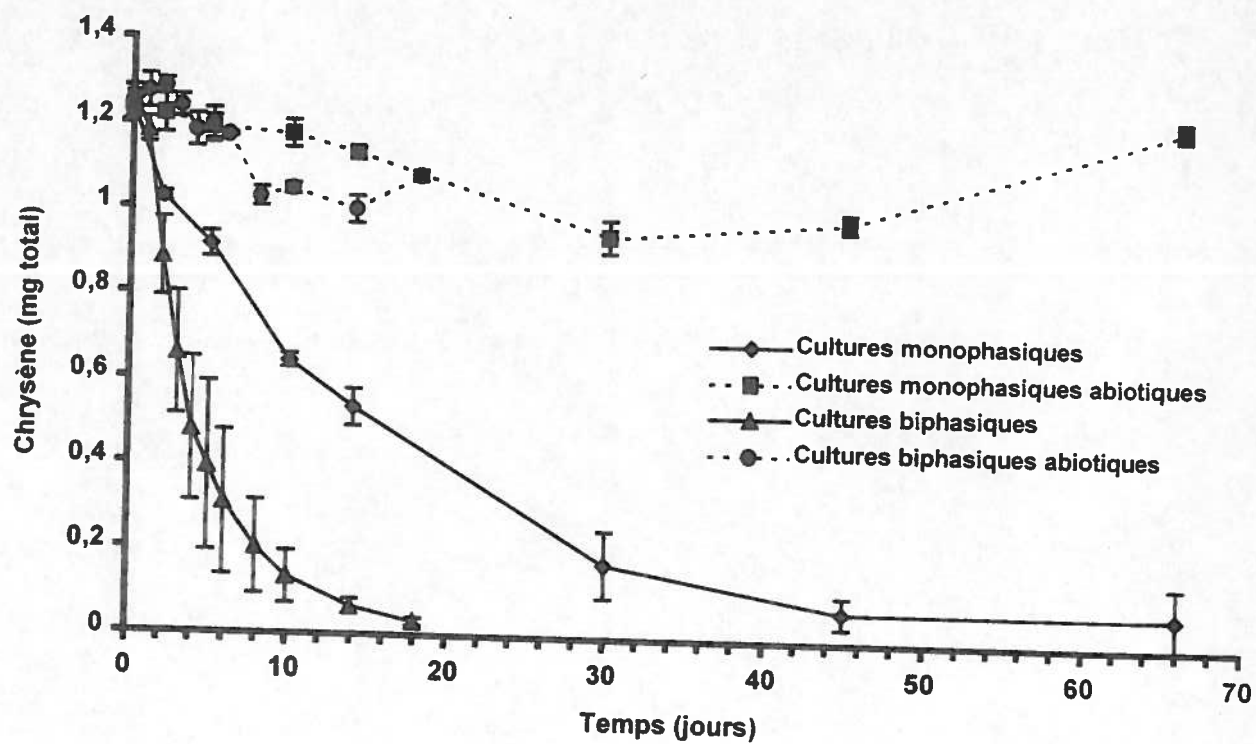


Figure 3 : Comparaison de la dégradation du chrysène par la souche ML1 en cultures monophasiques et biphasiques

3 Spectre d'activité de la souche ML1

Des cultures biphasiques ont été préparées avec divers HAP allant de 3 à 6 cycles afin de déterminer si la souche ML1, isolée par croissance sur le chrysène, pouvait dégrader d'autres HAP. Des cultures contenant du chrysène ainsi qu'un autre HAP ont été préparées en parallèle afin d'étudier l'effet de la présence du chrysène sur leur dégradation respective.

3.1 Cultures biphasiques avec HAP de 3 cycles

La souche ML1 n'a eu aucune difficulté à dégrader les deux HAP de 3 cycles testés au cours de cette maîtrise lorsque présents seuls en cultures biphasiques (tableau 5A). Des pourcentages de dégradation de 87 et 100 % respectivement ont été obtenus pour l'anthracène et le phénanthrène après 6 jours. L'ajout de chrysène aux milieux de cultures contenant de l'anthracène a permis d'obtenir de meilleurs taux de dégradation de ce dernier avec 100 % de dégradé après 6 jours. Dans le cas du phénanthrène, aucune augmentation significative du taux de dégradation a été observée en présence du chrysène.

3.2 Cultures biphasiques avec HAP de 4 cycles

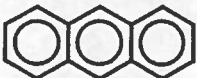
En plus de sa capacité à dégrader le chrysène (figure 4), la souche ML1 a aussi dégradé d'autres HAP à 4 cycles dont le fluoranthène et le benz[a]anthracène lorsqu'ils étaient seuls en cultures biphasiques (tableau 5B). Un maximum de 39,4 et 64,2 % du benz[a]anthracène et du fluoranthène respectivement ont été dégradés après 33 jours contre 94,3 % pour le chrysène après 10 jours. En présence de chrysène, la souche ML1 est aussi parvenu à co-métaboliser 15,1 % du pyrène après 33 jours.

Parmi ces HAP, les seuls à avoir eu un effet sur le taux de dégradation du chrysène sont le fluoranthène et le pyrène. Dans les cultures biphasiques contenant du fluoranthène et du chrysène, un ralentissement dans la vitesse de dégradation du chrysène a été observé à partir de la quatrième journée suivi d'un arrêt complet après 6 jours avec 68 % du chrysène dégradé (figure 5B). Cette inhibition de la dégradation du chrysène par la souche ML1 est survenue après la dégradation complète du fluoranthène dans les milieux de culture. La dégradation du pyrène a eu un effet de ralentissement sur la

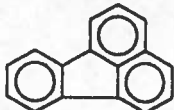
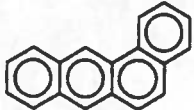
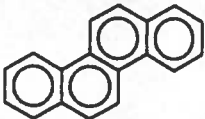
Tableau 5 : Spectre de dégradation des HAP de 3 et 4 cycles par la souche ML1

A) HAP de 3 cycles B) HAP de 4 cycles

A)

HAP	HAP dégradé (%)			
	<u>Seul</u>		<u>Avec chrysène</u>	
	3 jours	6 jours	3 jours	6 jours
<u>Anthracène</u> 	66.5 ± 4.8	87.2 ± 4	91.4 ± 2.1	100
<u>Phénanthrène</u> 	100	100	96.6 ± 3.1	100

B)

HAP	<u>Seul</u>		<u>Avec chrysène</u>	
	10 jours	33 jours	10 jours	33 jours
<u>Fluoranthène</u> 	48.5 ± 6.8	64.2 ± 4.9	92.4 ± 2.4	100
			Inhibition de la dégradation du chrysène	
<u>Benz[a]anthracène</u> 	20.1 ± 0.5	39.4 ± 0.4	N.D.	N.D.
<u>Chrysène</u> 	94.3 ± 2.3	100	N.D	N.D.
<u>Pyrène</u> 	0	0	23 ± 1.8	15.1 ± 1.2
			Ralentissement de la vitesse de dégradation du chrysène	

N.D. = non déterminé

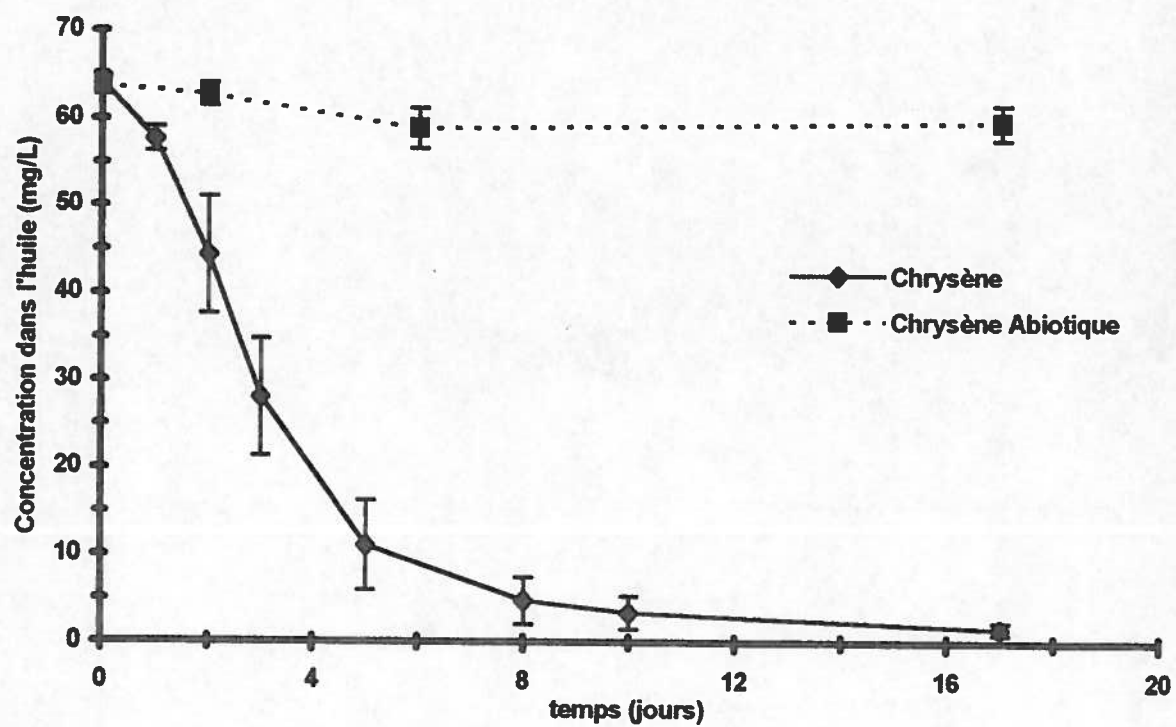
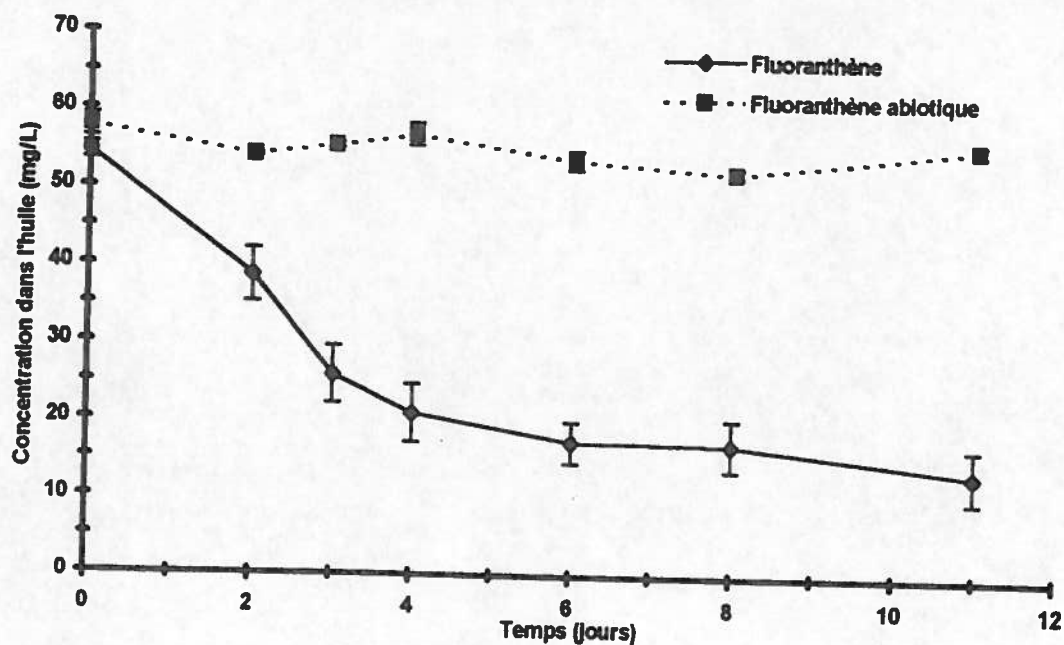


Figure 4 : Biodégradation du chrysène par la souche ML1

A)



B)

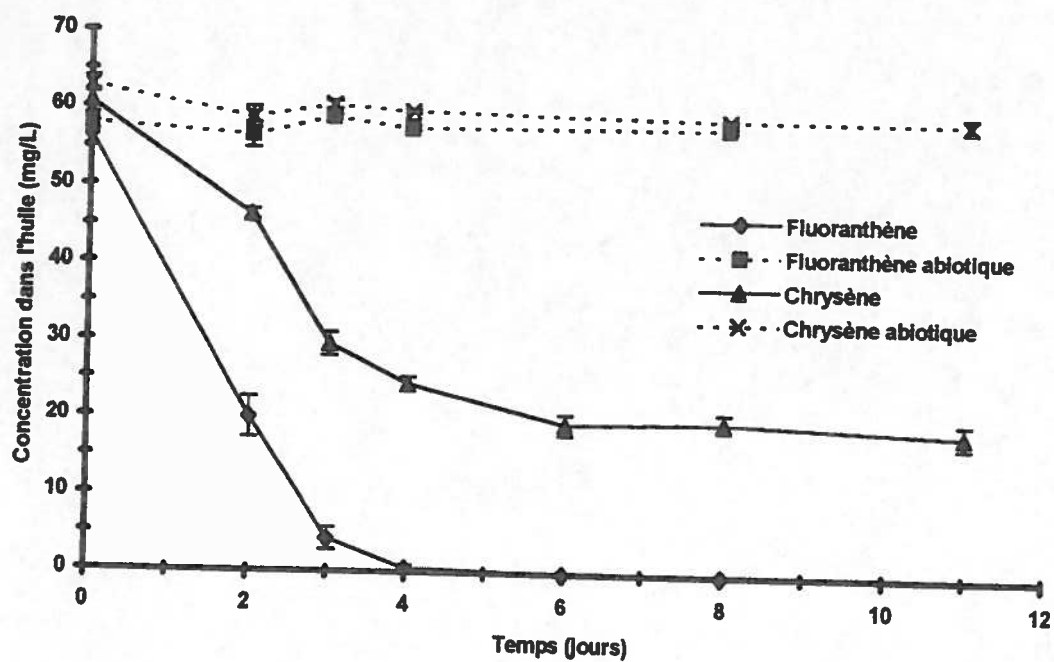
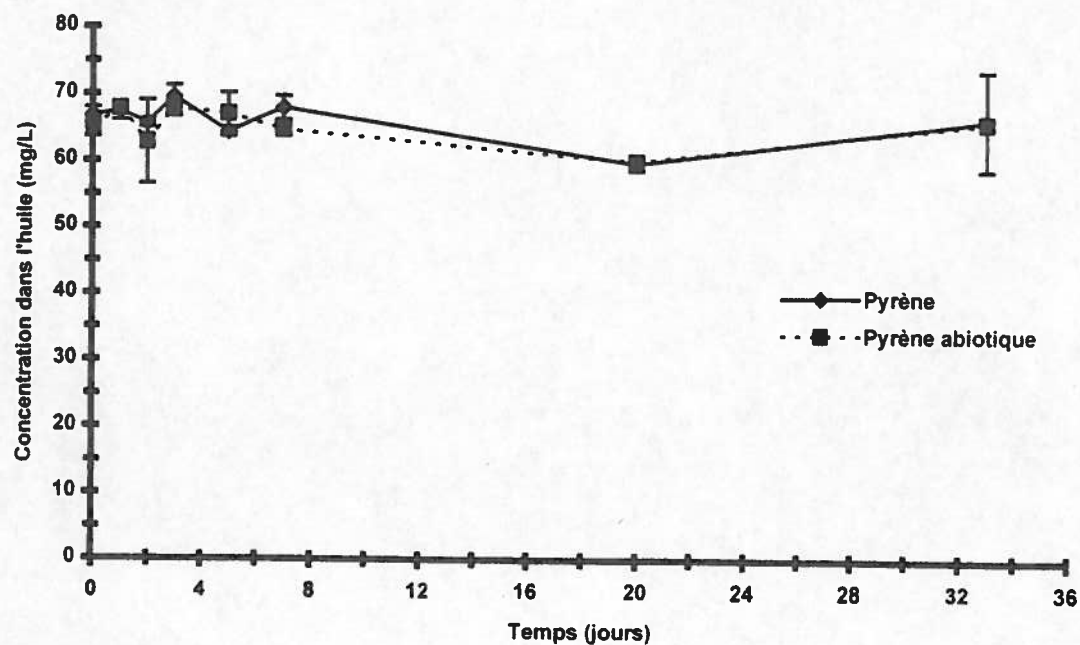


Figure 5 : Biodégradation du fluoranthène par la souche ML1. A) Fluoranthène seul
B) Fluoranthène et chrysène

A)



B)

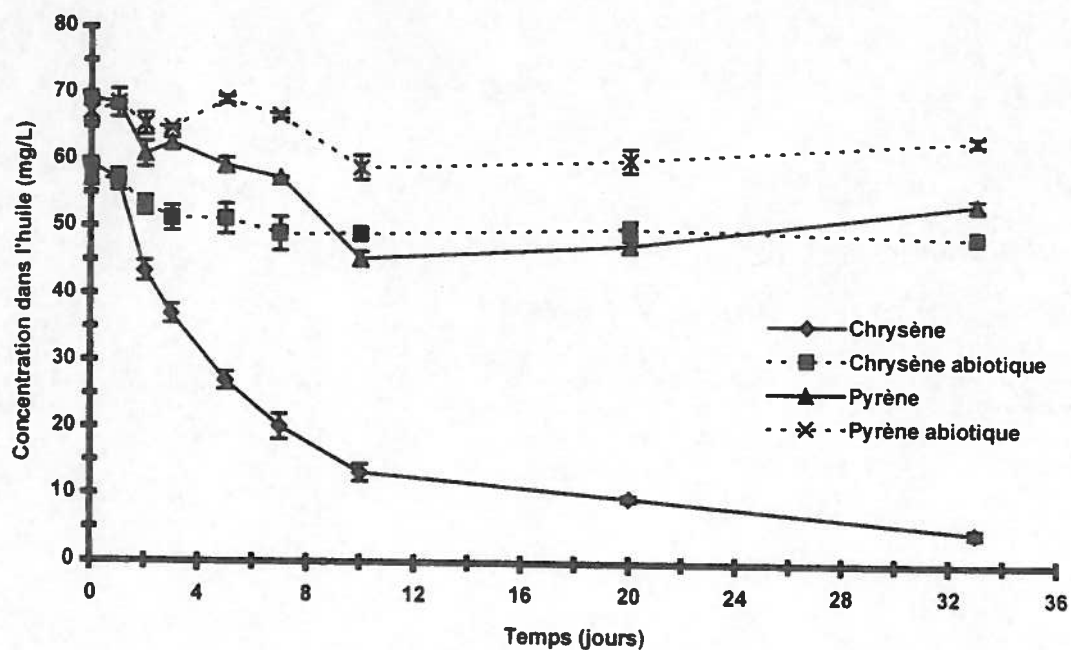


Figure 6 : Biodégradation du pyrène par la souche ML1. A)Pyrène seul
B)Pyrène et chrysène

dégradation du chrysène avec une dégradation du chrysène de 72,9 % après 10 jours en présence de pyrène (Figure 6B) comparés aux 94,3 % du chrysène dégradés lorsque ce dernier est seul. La souche ML1 a par la suite mis 23 jours pour arriver à dégrader 90 % du chrysène présent. L'effet du chrysène sur les taux de dégradation du benz[a]anthracène et vice versa, n'a pu être vérifié puisque ces deux HAP avaient des temps d'élution identiques lors des analyses par HPLC.

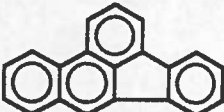
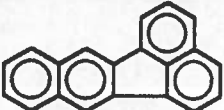
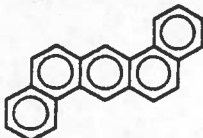
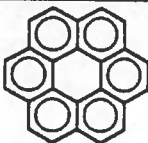
3.3 Cultures biphasiques avec HAP de 5 cycles

Des cultures biphasiques avec le benzo[a]pyrène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le dibenz[a,h]anthracène, ainsi que le pérylène comme seule source de carbone ont démontré que la souche ML1 était incapable de les dégrader (tableau 6). Lorsque le chrysène est présent, aucune dégradation significative du pérylène n'a été observée. Quant aux autres HAP, des faibles taux de dégradation variant entre 11,5 et 19 % ont été obtenus pour le benzo[a]pyrène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène et le dibenz[a,h]anthracène après 33 jours de culture (tableau 6). Les taux de dégradation du chrysène sont demeurés inchangés en présence de chacun de ces HAP.

3.4 Cultures biphasiques avec HAP de 6 cycles

Le coronène est le seul HAP à 6 cycles qui a été utilisé. Aucune dégradation du coronène par la souche ML1 n'a été observée lorsque seul ou en présence de chrysène en cultures biphasiques (tableau 6). Dans les cultures biotiques et abiotiques, la quantité de coronène mesurée est passée de 20 mg/L initialement à 6 mg/L après 33 jours d'incubation. Cette diminution correspond avec l'apparition d'un précipité blanc à ce moment dans l'huile de silicone. La vitesse de dégradation du chrysène n'a pas été affectée par la présence du coronène en cultures biphasiques.

Tableau 6 : Spectre de dégradation des HAP de 5 et 6 cycles par la souche ML1

HAP	<u>Seul</u>		<u>Avec chrysène</u>	
	10 jours	33 jours	11 jours	33 jours
<u>Benzo[a]pyrène</u> 	0	0	8.6 ± 3.4	15.2 ± 2.6
<u>Benzo[b]fluoranthène</u> 	0	0	10.6 ± 0.9	11.5 ± 0.7
<u>Benzo[k]fluoranthène</u> 	0	0	12.5 ± 1	19 ± 2.7
<u>Pérylène</u> 	0	0	0	0
<u>Dibenz[a,h]anthracène</u> 	0	0	0	17.9 ± 4.3
<u>Coronène</u> 	0	0	0	0

4 Minéralisation du chrysène

Afin de déterminer si la souche ML1 est capable de minéraliser le chrysène, des essais avec du chrysène marqué au ^{14}C ont été effectués. Lors des essais, la souche ML1 a transformé 38 % du [5, 6, 11, 12 - ^{14}C] chrysène en $^{14}\text{CO}_2$ après 15 jours avec une très bonne corrélation entre le chrysène résiduel et le chrysène minéralisé (figure 7). Par exemple, à partir du jour 4, un ralentissement a été observé à la fois dans la vitesse de dégradation du chrysène et dans le taux de minéralisation. Au jour 10, il y a un arrêt presque complet dans la dégradation du chrysène avec un résiduel de 6 % non dégradés alors que la minéralisation est presque plafonnée.

5 Importance du sol pour la dégradation du chrysène

Dans cette section, différents tests ont été effectués afin de déterminer l'importance du sol pour la dégradation du chrysène et pour préciser la nature des éléments du sol qui sont responsables de l'activation de la dégradation du chrysène.

5.1 Cultures avec différentes fractions du sol

Des cultures biphasiques contenant différentes fractions de sol ont été préparées et comparées entre elles. Les taux de dégradation les plus élevés ont été obtenus en présence de sol suivis de près par les cultures contenant l'extrait aqueux de sol (figure 8). En présence des minéraux du sol (sol pyrolysé), une dégradation partielle a été observée après 30 jours de culture. La dégradation la plus faible a été observée dans les cultures biphasiques sans sol.

5.2 Induction des voies de dégradation du chrysène

Les essais précédents ont établi que la souche ML1 présentait de meilleurs taux de dégradation pour le chrysène en présence de sol. Des études ont donc été entreprises pour déterminer si les composés du sol agissaient comme inducteur des voies de dégradation du chrysène. Pour ce faire, des cultures biphasiques sans sol ont été inoculées avec des cultures de la souche ML1 ayant été pré-incubées en présence d'un extrait de sol, de chrysène ou de chrysène avec extrait de sol.

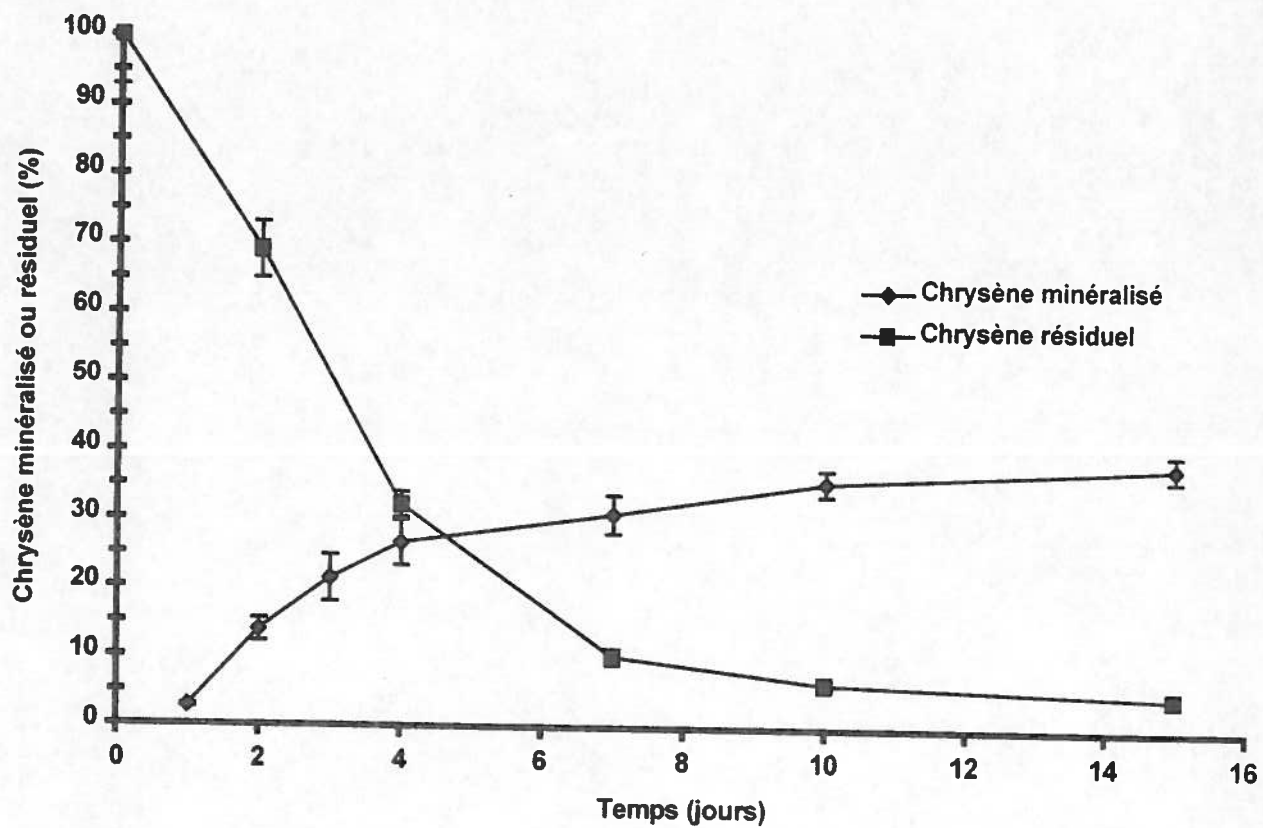


Figure 7 : Minéralisation et dégradation du chrysène par la souche ML1

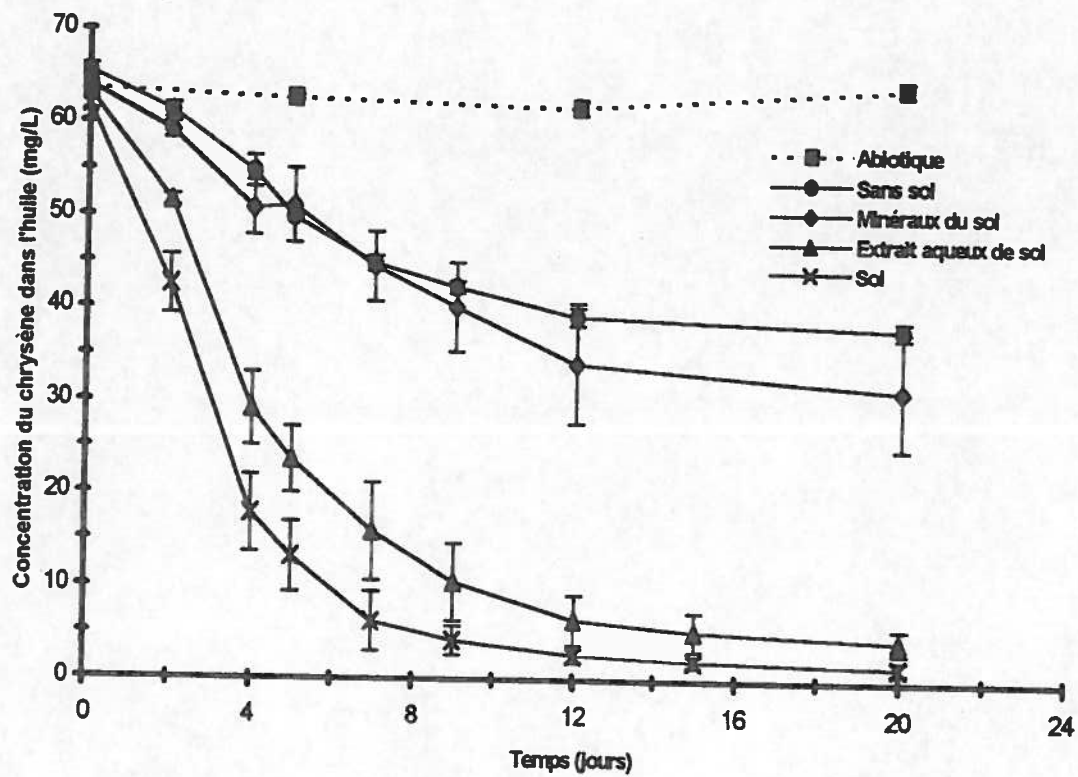


Figure 8 : Cultures biphasiques avec différentes fractions du sol

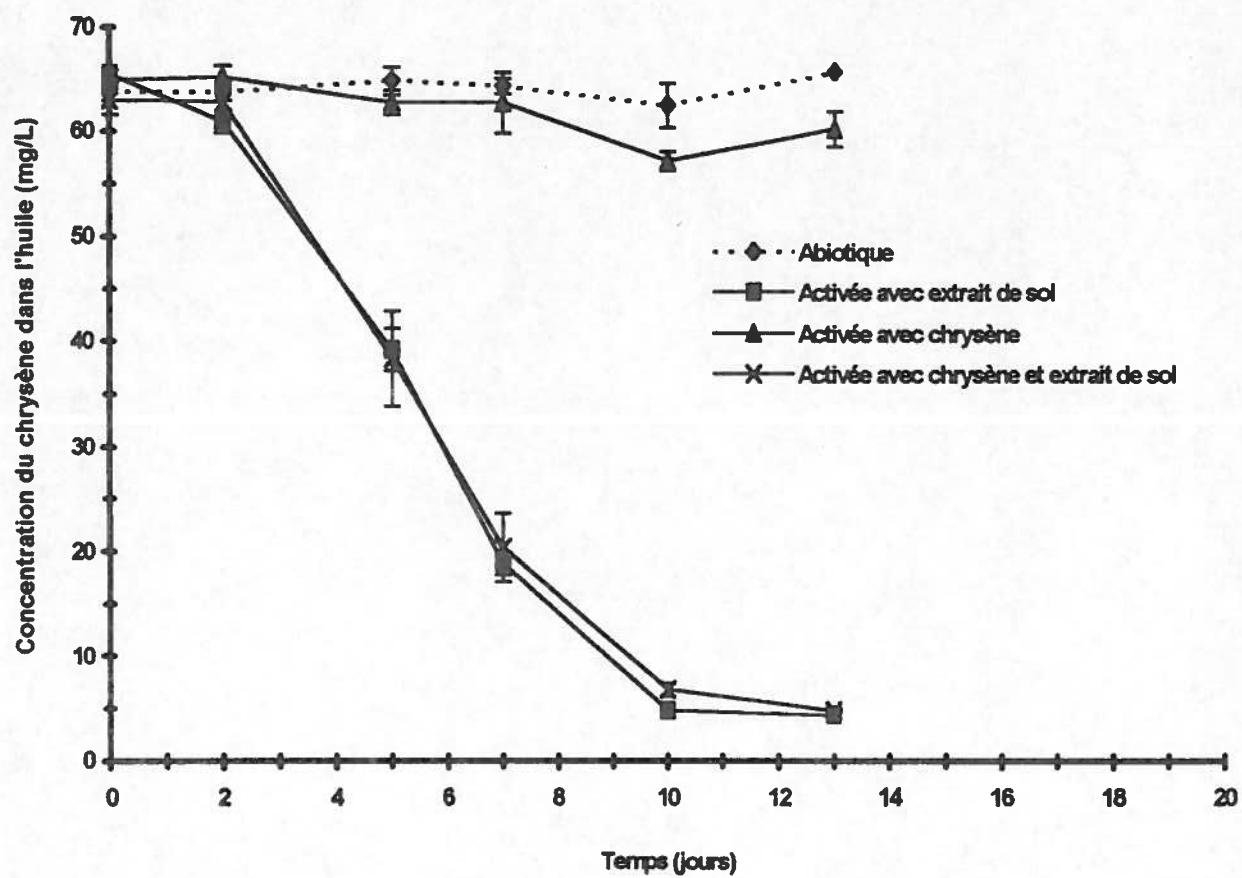


Figure 9 : Cultures biphasiques avec souche ML1 activée

Ces tests ont révélé des vitesses de dégradation pratiquement identiques pour les cultures pré-incubées en présence de l'extrait de sol ou de chrysène avec extrait de sol (figure 9). Dans les cultures biphasiques inoculées avec la souche ML1 après pré-incubation en présence de chrysène seulement, seul une très légère dégradation du chrysène a été observée au bout de 13 jours.

5.3 Cultures biphasiques avec extraits de sol

5.3.1 Extraction par solvants organiques

Des extractions avec divers solvants de la matière organique contenue dans un extrait aqueux de sol ont été effectuées et ont servi à remplacer le sol dans la préparation de cultures biphasiques. Pour ces essais, aucune dégradation significative du chrysène n'a été observée après 11 jours dans les cultures effectuées avec les ajouts d'extraits à l'hexane et à l'acétate d'éthyle (figure 10). De plus, aucune dégradation n'a été obtenue avec l'extrait aqueux épuisé (extrait aqueux ayant subi les extractions avec solvants). Seule les cultures biphasiques effectuées avec l'extrait aqueux de sol non-traité ont permis d'obtenir une dégradation du chrysène.

5.3.2 Extraction sur phase solide

Dans le même but que précédemment, une série de cultures biphasiques a été préparée avec un extrait aqueux de sol filtré sur un charbon activé (fraction minérale). Une autre série a été préparée à partir de la matière organique adsorbée sur le charbon en la désorbant à l'aide de méthanol (fraction organique). Les cultures biphasiques effectuées avec la fraction organique ont permis à la souche ML1 de dégrader le chrysène à une vitesse similaire à celle observée avec l'extrait aqueux de sol non traité (figure 11). Une très légère dégradation a été observée dans les cultures contenant la fraction minérale.

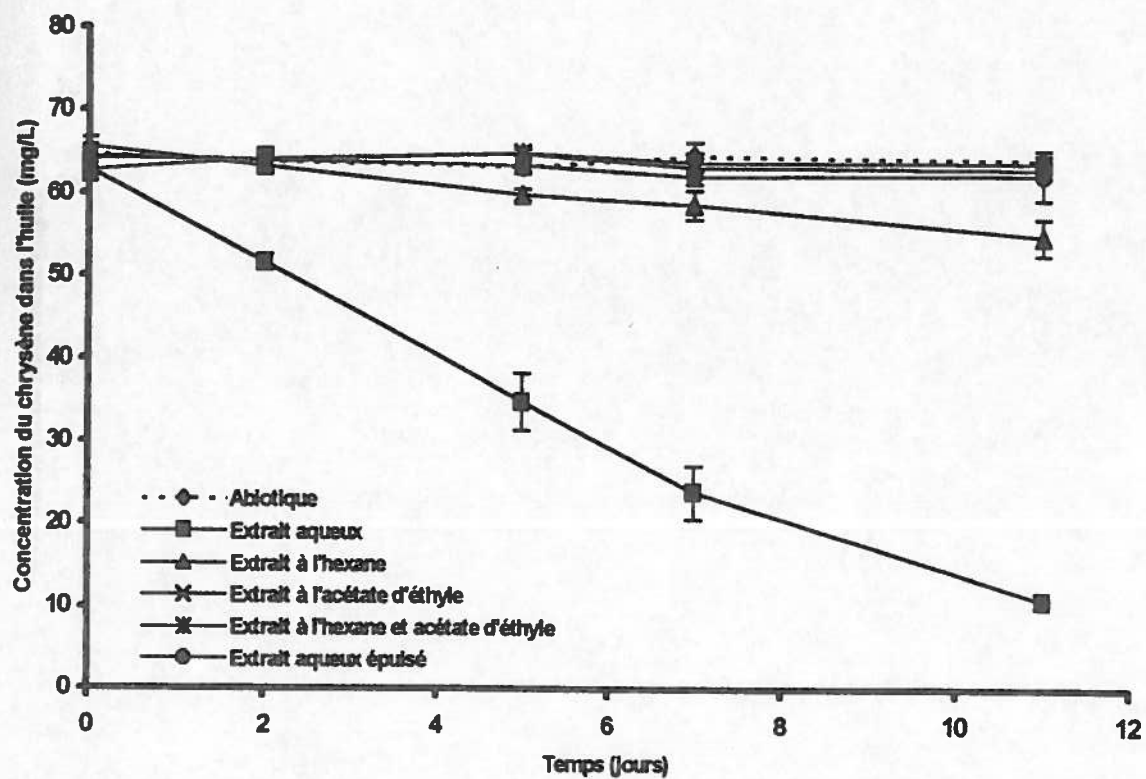


Figure 10 : Cultures biphasiques avec des extraits de sol réalisés avec différents solvants organiques

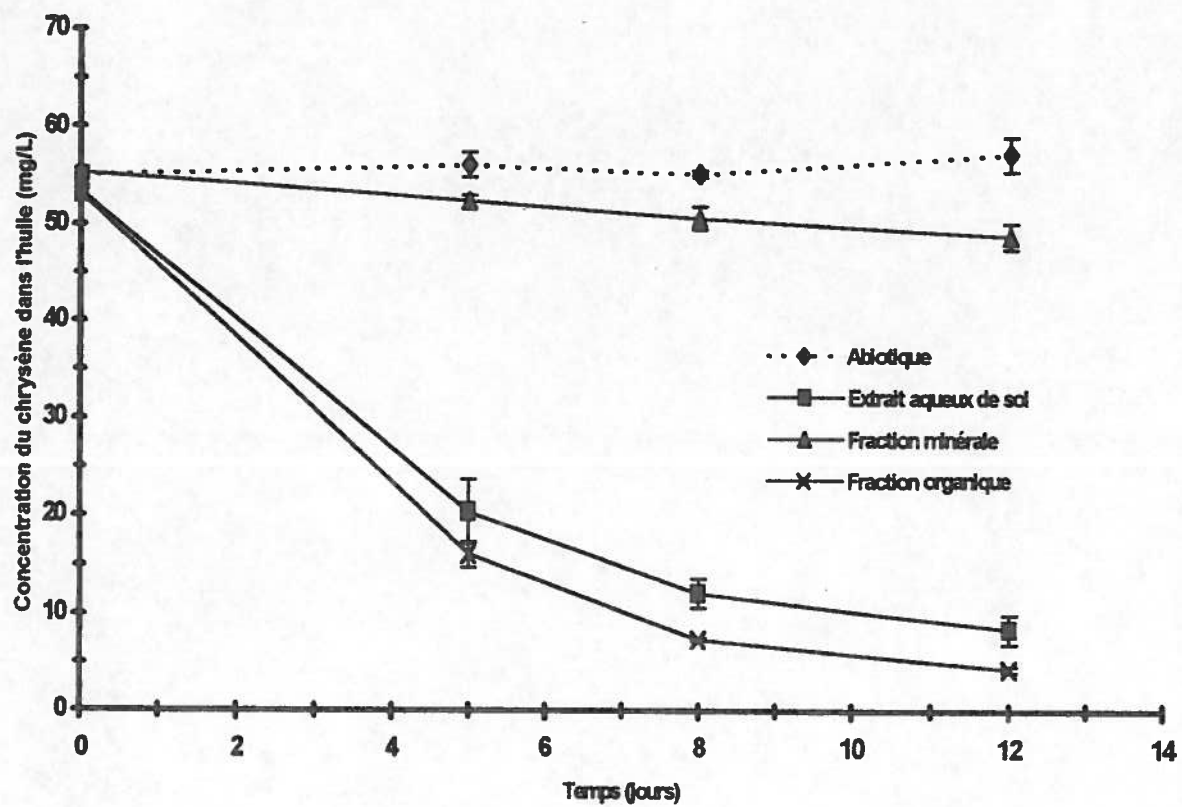


Figure 11 : Cultures biphasiques avec des extraits réalisés sur charbon activé

5.4 Cultures biphasiques en milieux plus riches

Des cultures biphasiques ont été effectuées en présence de milieu R2A liquide pour vérifier l'effet d'une autre source de carbone facilement assimilable sur les taux de dégradation du chrysène. Dans ces conditions, un faible taux de dégradation du chrysène a été obtenu après 28 jours et ce malgré une très forte croissance de la souche ML1 (figure 12). Dans les cultures biphasiques contenant du milieu R2A avec un extrait aqueux de sol, aucune dégradation significative n'a été observée pendant les quatre premiers jours après quoi la dégradation du chrysène a débuté pour atteindre un total de 45 mg/L enlevé après 28 jours.

5.5 Cultures biphasiques avec différents ajouts

Plusieurs produits disponibles commercialement ont été ajoutés aux cultures biphasiques à la place du sol afin de vérifier leurs effets sur la dégradation du chrysène. Malgré le fait que la meilleure dégradation a été observée dans les cultures biphasiques standards avec sol, des taux de dégradation intéressants ont quand même été obtenus avec les ajouts de vitamines et de minéraux suivi d'une dégradation moyenne dans les cultures contenant les acides humiques et d'une légère dégradation dans les cultures avec ajout d'acides résiniques (figure 13A, B). En présence de lignines hydrolitiques, aucune dégradation significative du chrysène n'a été observée après 29 jours.

6 Courbe de croissance

Cette expérience a permis de démontrer qu'il y avait une croissance de la souche ML1 en présence de chrysène comme seule source de carbone (figure 14). Initialement, lorsque la souche ML1 était présente en faible nombre, aucune dégradation significative du chrysène n'a été observée. Cependant, à partir du moment où la souche ML1 a atteint 10^4 bact/mL, la dégradation du chrysène s'est accélérée et la croissance bactérienne a augmenté de façon exponentielle jusqu'à un maximum de $4,5 \times 10^6$ bact/mL. Le compte bactérien s'est par la suite maintenu à ce niveau et un ralentissement de la vitesse de dégradation du chrysène a été observé. Dans cette expérience faite en absence de sol, les 2/3 du chrysène présent ont été dégradés au bout de 26 jours.

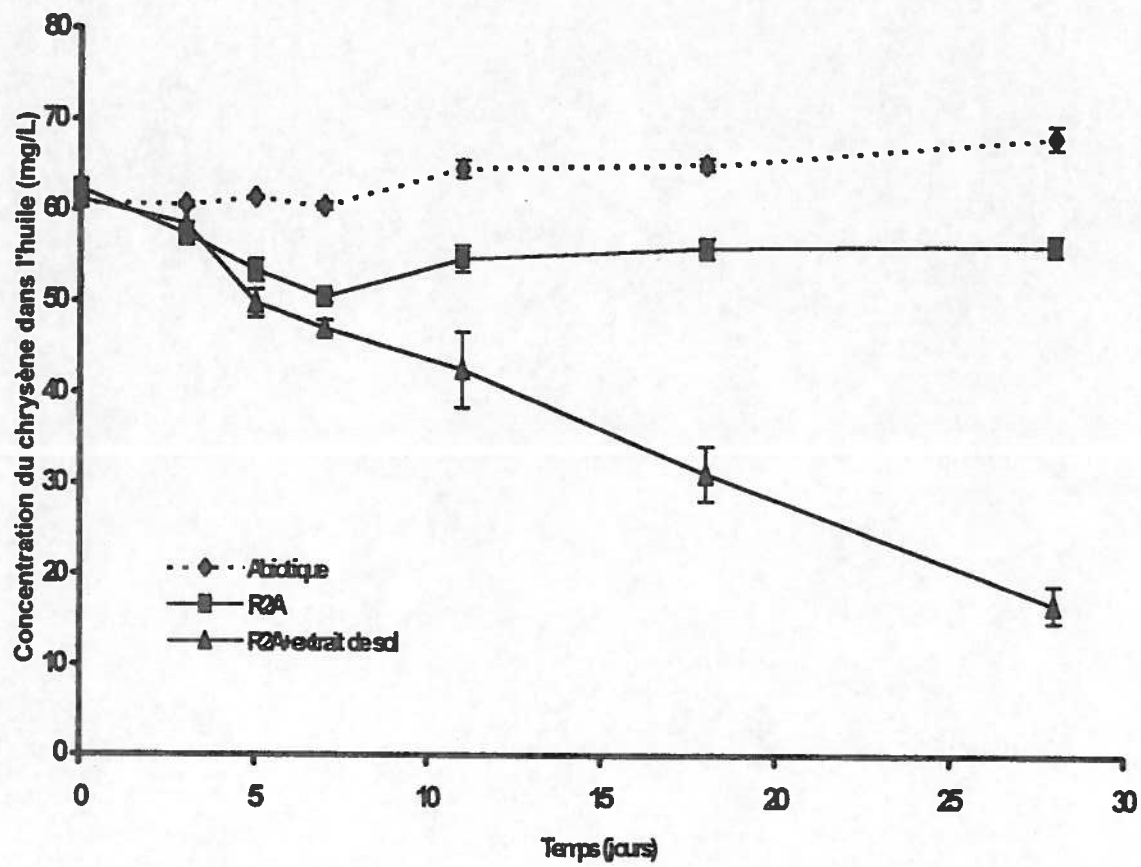
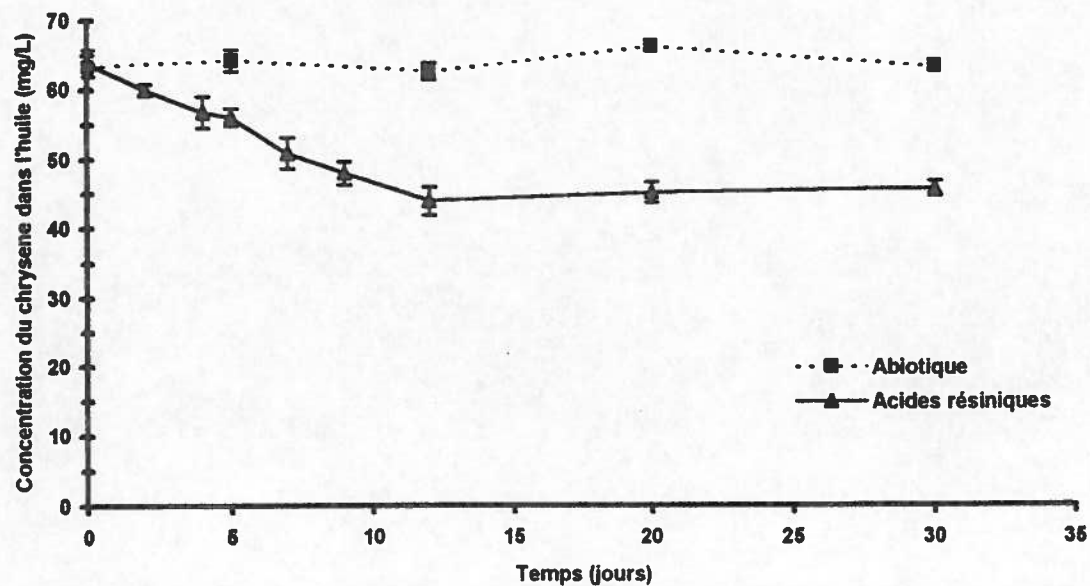


Figure 12 : Cultures biphasiques en milieu plus riche

A)



B)

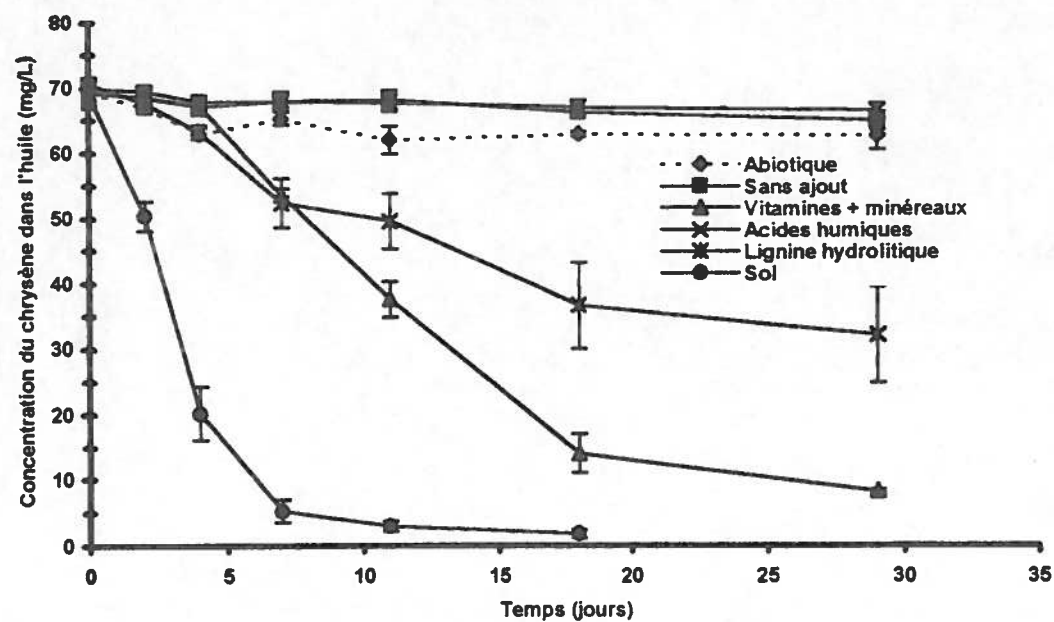


Figure 13 : Cultures biphasiques avec divers ajouts

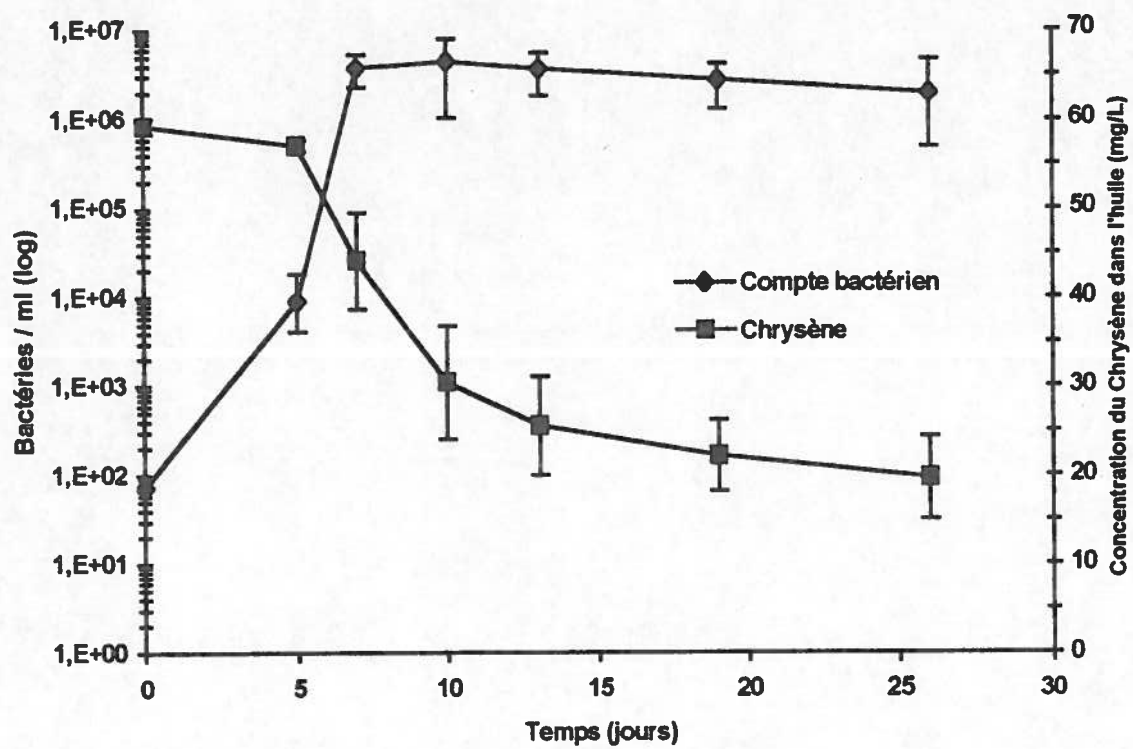


Figure 14 : Courbe de croissance de la souche ML1

7 Présence des gènes de dégradation des HAP

Deux séries de réaction d'amplification par PCR ont été effectuées en utilisant différentes températures d'appariement des amorces, la première à 55°C avec l'ADN de la souche ML1 et l'autre à 50°C avec l'ADN de la souche ML1 et celui de la souche *Sphingomonas* sp. 19R (témoin positif). Avec une température d'appariement des amorces de 55°C et les paires d'amorces DioG et DioD, FerG et FerD, ainsi que FerG et Isp, aucune amplification de l'ADN de la souche ML1 n'a été observée (figure 15). À cette température d'appariement, l'amplification d'ADN a seulement été observée avec les amorces universelles pA et pH. Il est à noter qu'une légère amplification d'ADN a été observée avec les témoins négatifs (sans ADN) en utilisant les amorces universelles pA et pH. Il s'agit d'un problème récurrent dans le laboratoire de biologie moléculaire dû à un problème de contamination de certains réactifs

Avec l'ADN du témoin positif et une température d'appariement de 50°C, une bande de 0,3 kb avec les amorces FerG et FerD, de 0,4 kb avec les amorces DioG et DioD et de 2,3 kb avec les amorces FerG et Isp a été obtenue (figure 16). Aucune bande de ces longueurs respectives n'a été observée avec l'ADN de la souche ML1. Du à la faible température d'appariement des amorces, de petites amplifications d'ADN non spécifiques ont été observées avec l'ADN du témoin positif et l'ADN de la souche ML1. Une bande de 1.5 kb a été obtenue avec l'ADN des deux souches en utilisant les amorces universelles pA et pH.

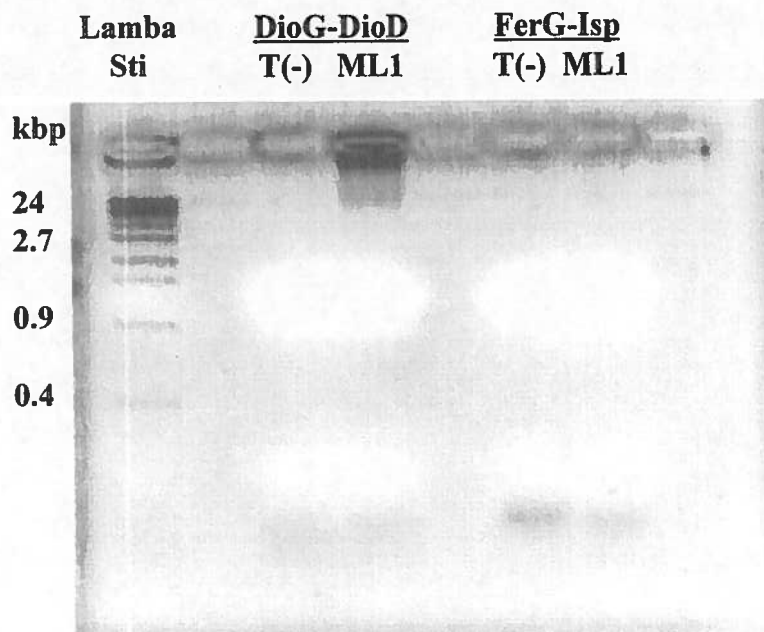
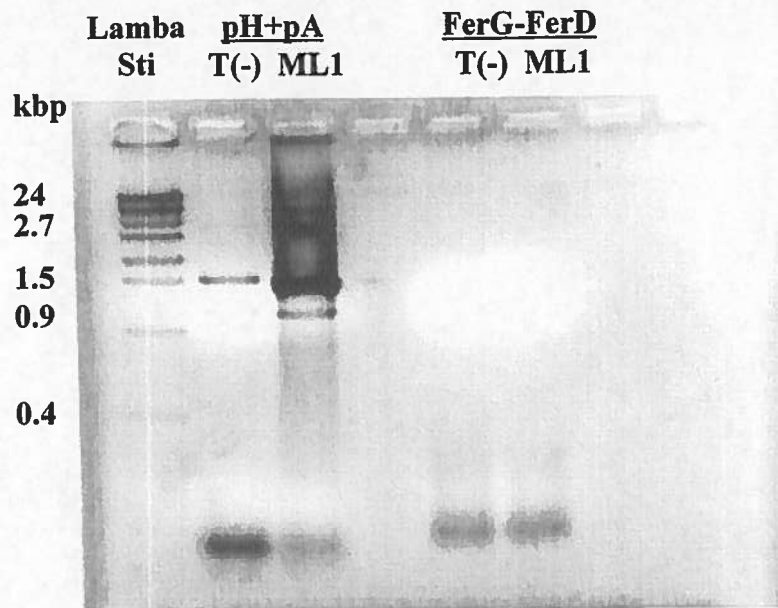


Figure 15: Présence des gènes de dégradation des HAP avec une température d'hybridation des amorces de 55°C

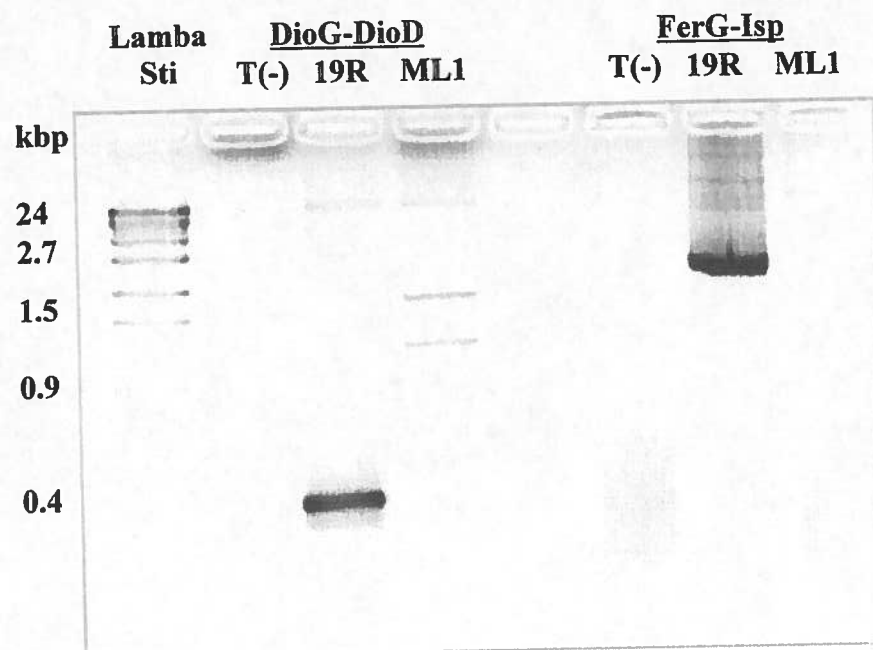
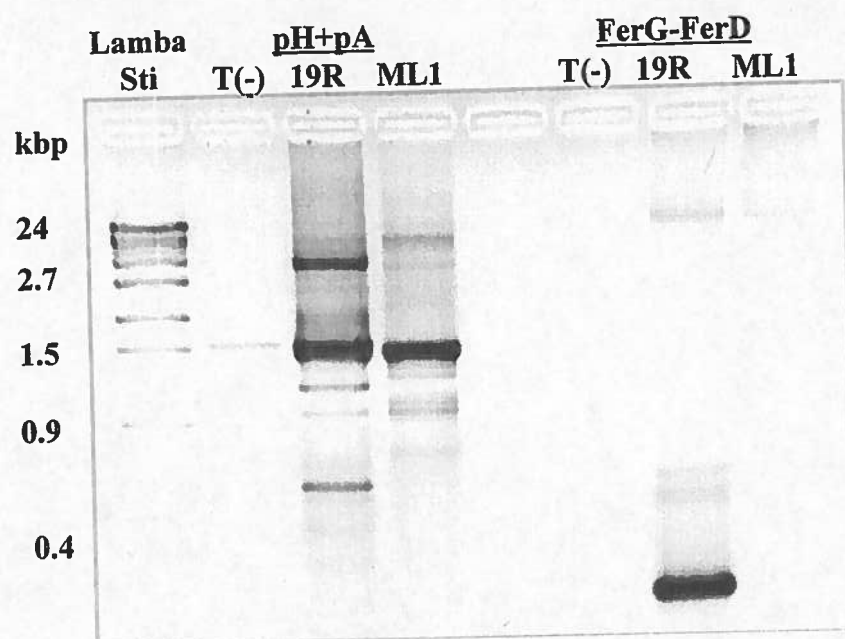


Figure 16 : Présence des gènes dégradation des HAP avec une température d'hybridation des amorces de 50°C

8 Identification du composé du sol responsable de l'activation de la voie de dégradation du chrysène

Divers extraits de sol ont été effectués afin d'identifier le composé responsable de l'activation des voies de dégradation du chrysène. Seuls les essais effectués en adsorbant la fraction organique du sol sur un charbon activé et en la désorbant à l'aide d'un lavage au méthanol ont donné des résultats positifs pour la dégradation du chrysène (voir section 5.3.2). L'analyse par GC-MS de cet extrait au méthanol a permis d'observer la présence de nombreux pics sur le chromatogramme avec des temps de rétentions entre 10 et 20 minutes et un pic majeur avec un temps de rétention entre 21,5 et 22,5 minutes (figure 17B). Le spectre de masse de chacun de ces pics était absent du témoin (figure 17A).

La signature fait par spectrométrie de masse de ces différents pics minoritaires et majoritaires observé sur le chromatogramme révèle la présence de fragments avec un poids moléculaire de 204, 217, 271 et 361 u.a. (unités atomiques) selon des proportions différentes dépendant du pic (figure 18A). Ces fragments de 204, 217, 271 et 361 u.a. ont été utilisés comme critères de recherche dans les banques informatisées de spectres de masse de produits. De cette recherche, les sucres en sont ressortis comme les composés les plus probables. Le glucose étant une des hypothèses possible, il a été vérifié sur GC-MS dans les mêmes conditions que le composé inconnu mais son temps de rétention s'est avéré trop court par rapport au pic majeure observé sur le chromatogramme même si sa signature au spectre de masse est semblable (figure 18C). Par la suite, nous avons analysé le cellobiose, un disaccharide, qui a donné un temps de rétention et une signature de spectre de masse très proche de celui du composé inconnu recherché (figure 18B). Il reste qu'une analyse plus exhaustive de divers disaccharides devra être effectuée afin d'obtenir 100% d'homologie et de cerner de façon plus précise le composé inconnu.

Il est à noter que la présence de certains des pics mineurs observé dans les chromatogrammes sont générés lors de la sililation de l'échantillon pour l'analyse au GC-MS. Cette sililation d'un même composé initial donne par encombrement stérique plusieurs produits de synthèse. Ceci peut facilement être visualisé à la figure 18C où la sililation d'un échantillon de glucose pure avec du BSTFA a généré 5 pics différents dont les temps de rétentions sont situés entre 15 et 20 minutes sur le chromatogramme.

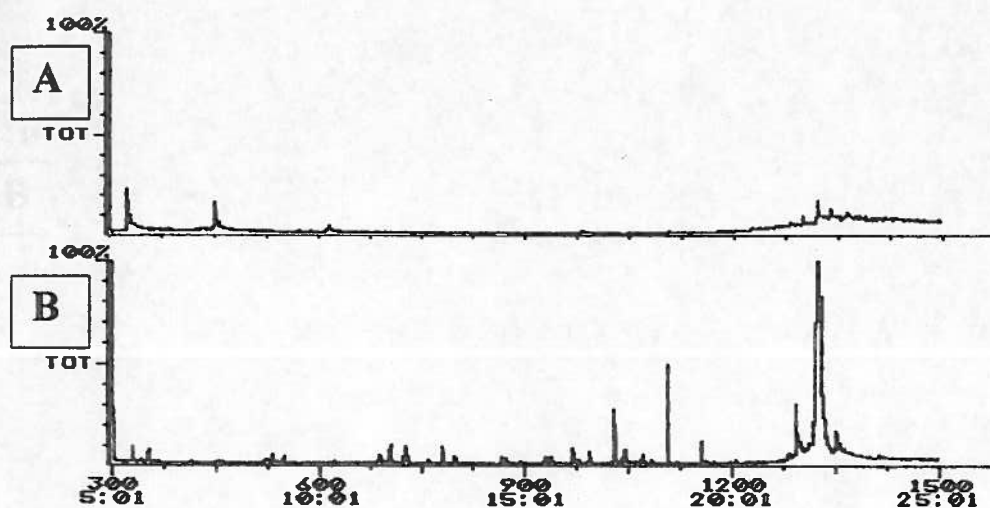


Figure 17 : Chromatogramme de l'extrait de sol obtenu à l'aide de charbon activé et de méthanol. A) Extrait méthanolique du charbon activé seul B) Extrait méthanolique du charbon activé ayant préalablement adsorbé la matière organique d'un extrait aqueux de sol

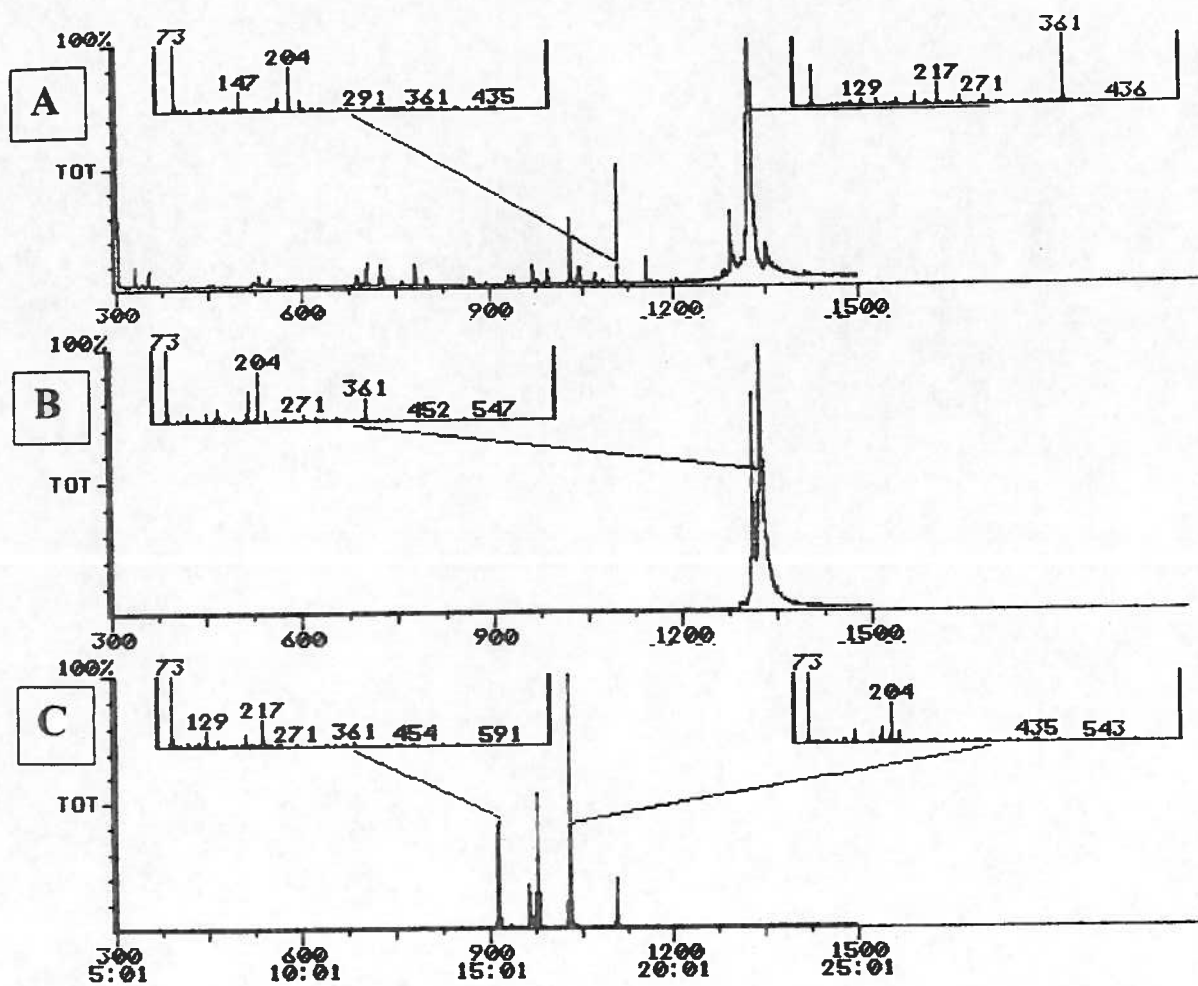


Figure 18 : Comparaison des chromatogrammes et spectres de masse de divers composés.
A) Extrait au méthanol B) Cellobiose C) Glucose

9 Identification des intermédiaires de dégradation du chrysène

Diverses extractions de cultures monophasiques et biphasiques ont été effectuées avec des solvants organiques suivi d'analyses par HPLC, LC-MS et par GC-MS sans aucun résultat positif (résultats non illustrés). Cependant, certains résultats ont été obtenus en combinant plusieurs solvants dont l'éther, l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le chloroforme pour faire une extraction en milieu acide d'une culture biphasique après dégradation partielle du chrysène. L'analyse par GC-MS des extraits combinés a permis d'observer l'apparition de pics qui étaient absents des témoins abiotiques (figure 19). Cinq pics différents ont été observés sur le chromatogramme mais une analyse de leur spectre de masse dans la banque informatique de 60000 produits n'a pas permis d'identifier un composé ayant un spectre de masse homologue.

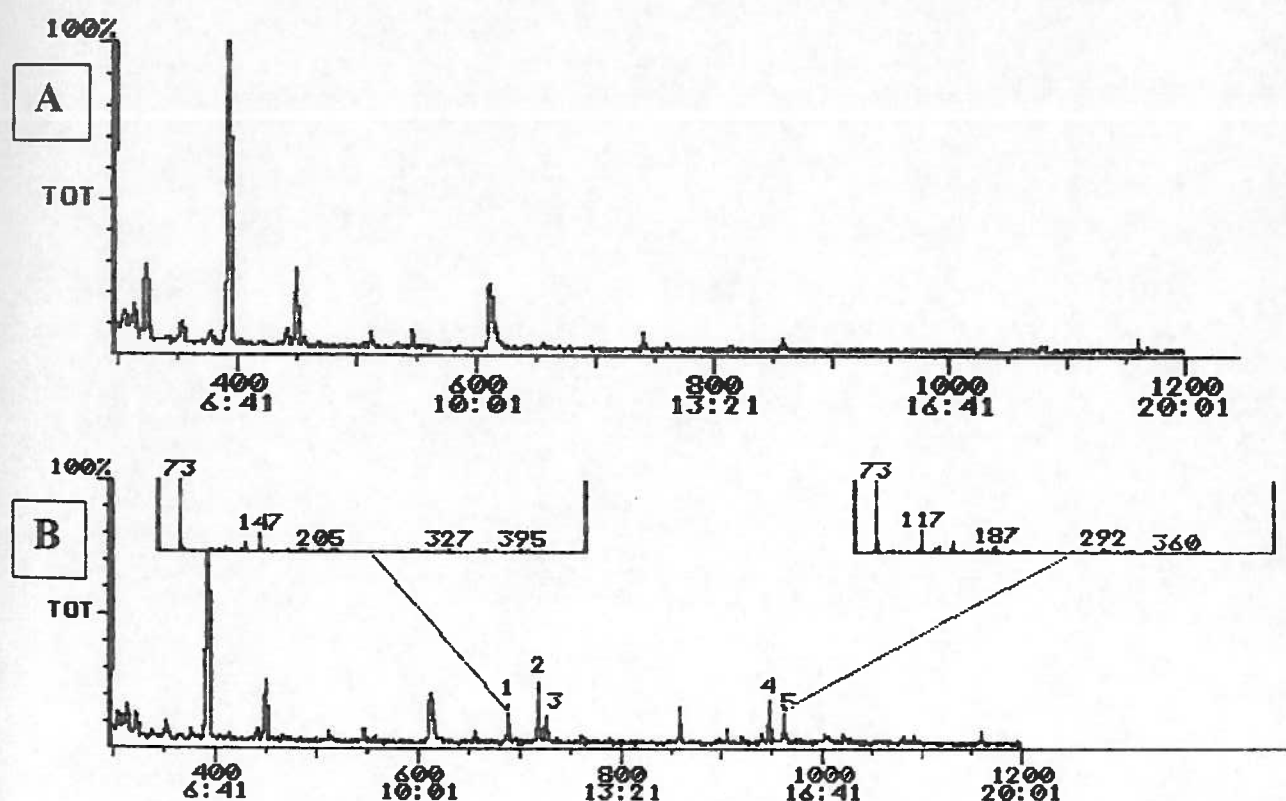


Figure 19 : Chromatogramme et spectre de masse des intermédiaires de dégradation du chrysène A) Témoin abiotique B) Extrait de cultures biphasiques

DISCUSSION

1 Souche dégradant le chrysène

1.1 Isolement

A notre connaissance, nous sommes les seuls à être parvenus à isoler une souche bactérienne pouvant dégrader le chrysène à partir de la microflore indigène d'un sol contaminé en utilisant le chrysène comme principale source de carbone. La plupart des autres souches reconnues pour leur capacité de dégrader le chrysène ont d'abord été isolées après croissance en présence d'un autre HAP à l'exception de la souche *Pseudomonas fluorescens* qui a été sélectionnée par croissance sur gélose contenant du chrysène avec des ajouts de peptone, d'extrait de levure et d'amidon (Caldini *et al.*, 1995). Parmi les autres, il y a la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 qui a été isolée par croissance sur du phénanthrène (Stringfellow *et al.*, 1994), la souche *Rhodococcus* sp. UW1 isolée par croissance sur du pyrène (Walter *et al.*, 1991) et la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 isolée par croissance sur du fluoranthène (Mueller *et al.*, 1990).

La persistance des HAP de haut poids moléculaire dans l'environnement est due au fait qu'ils sont difficilement accessibles aux micro-organismes compte tenu de leur très faible solubilité en milieux aqueux et de leur adsorption sur la matière organique du sol (Cerniglia *et al.*, 1992). L'utilisation de cultures biphasiques a été une bonne stratégie pour isoler une souche dégradant le chrysène puisqu'elle a contribué à augmenter significativement la biodisponibilité du chrysène dans les milieux de culture. Autrement, l'isolement d'une souche pure aurait été beaucoup plus difficile. Ceci a été confirmé lors des expériences comparant la dégradation du chrysène en cultures biphasiques avec la dégradation en cultures monophasiques dans lesquelles des taux de dégradation du chrysène plus de trois fois supérieurs ont été obtenus avec les cultures biphasiques. Aussi, il est à noter que nous sommes les seuls à avoir utilisé une telle stratégie pour l'isolement d'une souche pure dégradant un HAP lourd même si d'autres chercheurs avant nous avaient réussi à montrer une meilleure dégradation des HAP en cultures biphasiques (Marcoux *et al.*, 2000; Vanneck *et al.*, 1995; Villemur *et al.*, 2000).

1.2 Identification

L'utilisation de tests biochimiques combinés au séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S nous a permis d'identifier la souche ML1 comme appartenant au genre

Sphingomonas. Ce genre bactérien est largement répandu dans le sol, l'eau et les sédiments, et les souches isolées de ces environnements ont un large spectre d'activité, ce qui leur confère un fort potentiel pour la biodégradation de polluants. Parmi les contaminants dégradés par les diverses souches de *Sphingomonas*, on retrouve les dioxines, le dibenzofurane, l'hexachlorocyclohexane, les biphényles chlorés, le pentachlorophénol, les éthers halogénés, les acides naphthalenesulfoniques, le toluène, le naphthalène, le xylène ainsi qu'une vaste gamme d'hydrocarbures aromatiques polycycliques incluant le chrysène (Balkwill *et al.*, 1997). À part nous, Mueller *et al.* (1990) sont les seuls à avoir identifié un *Sphingomonas* pouvant dégrader le chrysène. Les autres souches isolées pouvant dégrader le chrysène appartiennent au genre *Rhodococcus* et *Pseudomonas* (Caldini *et al.*, 1995; Chen et Aitken, 1999; Walter *et al.*, 1991).

1.3 Capacités de dégradation du chrysène

Des vitesses de dégradation moyennes et maximales de 1,4 et 3,3 mg/L par jour respectivement ont été obtenues avec la souche *Sphingomonas* sp. ML1 en cultures biphasiques. Pour pouvoir faire une comparaison adéquate avec les autres souches dégradant le chrysène, il aurait fallu utiliser les vitesses de dégradation spécifiques du chrysène, c'est-à-dire la vitesse de dégradation par unité de biomasse. Étant donné la difficulté à suivre la croissance et à déterminer la biomasse totale en cultures biphasiques, nous n'avons pas ce genre d'information. Même si nous l'avions, étant donné qu'elle est absente de la plupart des articles sur la dégradation du chrysène, il aurait été difficile de dire laquelle des souches est la plus efficace par unité de biomasse. Malgré cela, une comparaison de nos résultats avec ceux des autres chercheurs ayant isolé des souches qui dégradent les HAP nous révèle que très peu d'entre elles peuvent dégrader le chrysène et que les vitesses de dégradation que nous avons observées sont parmi les plus élevées (Kanaly, 2000). Il est à noter que contrairement à la souche *Sphingomonas* sp. ML1, les souches dégradant le chrysène étaient soit activées par croissance préalable sur un HAP autre que le chrysène ou bien cultivées en présence d'un autre HAP ou d'une source de carbone plus facilement assimilable. Parmi celles là, les taux de dégradation les plus élevés du chrysène ont été obtenus par Walter *et al.* (1991) avec la souche *Rhodococcus*

UW1 qui pouvait co-métaboliser jusqu'à 100 mg/L de chrysène en 2 semaines (7.1 mg/L-j) en présence de pyrène. Ils ont aussi affirmé que la souche *Rhodococcus* UW1 pouvait croître et dégrader le chrysène lorsque présent comme seule source de carbone malgré le fait qu'aucune valeur n'a été donnée. Il n'est pas indiqué non plus si la souche avait été pré-incubée sur du pyrène avant les essais. Ye *et al.* (1996) ont aussi obtenu des taux de dégradation élevés du chrysène soit de 3,15 mg/L de chrysène après 16 heures (4,73 mg/L-j) par la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 après préculture de cette dernière sur du fluoranthène. La souche EPA505 était cependant incapable de dégrader ou de croître sur le chrysène lorsque présent comme seule source de carbone. Il y a aussi la souche *Pseudomonas fluorescens* avec laquelle des taux de dégradation beaucoup plus faibles de 0,64 mg/L après 8 jours (0,08 mg/L-j) ont été obtenus en présence d'autres sources de carbone plus facilement assimilables (Caldini *et al.*, 1995). Aucun essai n'a cependant été effectué en absence des sources de carbone additionnelles pour voir s'il y avait toujours dégradation. Enfin, il y a la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 avec laquelle une dégradation de 0,063 mg/L-j a été obtenue après pré-incubation en présence de salicylate (Chen et Aitken, 1999)

2 Spectre de dégradation des HAP

Les essais effectués en remplaçant le chrysène par d'autres HAP de 3 à 6 cycles aromatiques ont montré que la souche ML1 pouvait facilement dégrader les HAP de 3 cycles comme l'anthracène et le phénanthrène. Ceci n'est pas surprenant étant donné que ces HAP sont reconnus pour être plus facilement dégradables (Bouchez *et al.*, 1996b; Cerniglia *et al.*, 1992). Parmi les souches dégradant le chrysène, Mueller *et al.* (1990) de même que Walter *et al.* (1991) ont démontré que la souche *Pseudomonas paucimobilis* EPA505 et la souche *Rhodococcus* sp. UW1 respectivement pouvaient dégrader l'anthracène et le phénanthrène. Chen et Aitken (1999) ont aussi démontré que la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 pouvait dégrader le phénanthrène mais n'ont fait aucun essai avec l'anthracène. Aucune tentative n'a été effectuée par Caldini *et al.* (1995) pour vérifier si la souche *Pseudomonas fluorescens* pouvait dégrader ces deux HAP.

En plus du chrysène, la souche ML1 pouvait aussi dégrader d'autres HAP ayant 4 cycles aromatiques comme le fluoranthène et le benz[a]anthracène lorsque présents seuls en culture biphasique ainsi que le pyrène lorsqu'en présence de chrysène. Quoique plusieurs articles aient été publiés sur des souches pouvant dégrader le fluoranthène (Barkey *et al.*, 1999; Kelley et Cerniglia, 1991; Mueller *et al.*, 1990; Weissenfels *et al.*, 1990; Willumsen *et al.*, 1998), ceux portant sur des souches qui dégradent le benz[a]anthracène lorsque présent comme seule source de carbone sont beaucoup plus rares (Caldini *et al.*, 1995; Chen et Aitken, 1999; Juhasz *et al.*, 1997b). Parmi les souches dégradant le chrysène, Caldini *et al.* (1995) ont démontré que la souche *Pseudomonas fluorescens* pouvait dégrader de faibles quantités de benz[a]anthracène en présence d'autres sources de carbone contrairement à la souche ML1 qui pouvait en dégrader des quantités nettement supérieures lorsque présent seul. Chen et Aitken (1999) ont aussi démontré que la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 pouvait dégrader de faibles quantités de fluoranthène et de benz[a]anthracène après préculture sur du salicylate. La souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, comme la souche ML1, a été capable de dégrader le fluoranthène lorsque présent seul en culture (Mueller *et al.*, 1990). La souche EPA505 a aussi été capable de dégrader des quantités significatives de benz[a]anthracène mais seulement après préculture de la souche sur du fluoranthène (Ye *et al.*, 1996). Enfin, Walter *et al.* (1991) ont aussi affirmé que la souche *Rhodococcus* sp. UW1 pouvait dégrader et croître sur le fluoranthène lorsque présent comme seule source de carbone sans pour autant fournir de valeur spécifique. Ils ont aussi démontré que la souche pouvait facilement le dégrader par co-métabolisme en présence de pyrène. Pour ce qui est du benz[a]anthracène, contrairement à la souche ML1, la souche *Rhodococcus* sp. UW1 était incapable de le dégrader. Concernant le pyrène, bien que les quantités dégradées par la souche ML1 soient significatives, aucune dégradation de ce dernier n'a été observée en absence de chrysène. Il existe plusieurs exemples de souches dans la littérature qui ont été isolées par croissance sur du pyrène et qui sont par conséquent beaucoup plus efficaces dans la dégradation de ce composé que la souche ML1 (Kanaly, 2000). Entre autres, il y a les trois souches de *Burkholderia cepacia* isolées par Juhasz *et al.* (1996) par croissance sur du pyrène qui pouvaient en dégrader d'importantes concentrations lorsque présent comme seule source de carbone. Ces souches étaient

cependant incapables de dégrader le chrysène. Parmi les souche dégradant le chrysène, seul la souche *Rhodococcus* sp. UW1, isolée d'un sol contaminé aux hydrocarbures par croissance sur du pyrène, a été capable de dégrader de fortes quantités de ce dernier lorsque présent seul en culture (Walter *et al.*, 1991). Comme la souche ML1, la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505 (Ye *et al.*, 1996) nécessitait aussi la présence d'un autre HAP, dans ce cas ci du fluoranthène, pour pouvoir dégrader le pyrène tandis que la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 (Chen et Aitken, 1999) avait besoin d'être induite en présence de salicylate pour qu'il y ait dégradation.

Pour ce qui est des HAP de 5 à 6 cycles, la souche ML1 était incapable de les dégrader lorsque seuls en culture biphasique mais elle pouvait co-métaboliser la plupart des HAP de 5 cycles testés comme le benzo[a]pyrène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène et le dibenz[a,h]anthracène lorsque le chrysène était présent. Une comparaison avec les autres souches dégradant le chrysène nous révèle que la souche ML1 possède un spectre de dégradation assez large pour les HAP de 5 cycles. Ye *et al.* (1996), avec la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505, sont les seuls à avoir rapporté des résultats de dégradation similaires à la souche ML1 pour le benzo[a]pyrène, le benzo[b]fluoranthène et le dibenz[a,h]anthracène après préculture de leur souche sur du fluoranthène contrairement à la souche ML1 qui nécessitait la présence de chrysène. Chen et Aitken (1999) ont quant à eux observé de faibles dégradations du benzo[a]pyrène par la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 en présence de phénanthrène mais n'ont fait aucun essai en présence des autres HAP lourds. Pour ce qui est de Walter *et al.* (1991) avec la souche *Rhodococcus* sp. UW1, ils ont effectué des essais de dégradation en présence de benzo[a]pyrène et de dibenz[a,h]anthracène mais aucune dégradation significative n'a été observée même en présence d'un autre HAP. Parmi les souches ne pouvant dégrader le chrysène mais qui ont des spectres de dégradation des HAP lourds assez larges, il y a les trois souches de *Burkholderia cepacia*, isolées par Juhasz *et al.* (1996) d'un terrain contaminé aux HAP par croissance sur le pyrène. Contrairement à la souche ML1, elles pouvaient dégrader des quantités significatives de coronène, un HAP lourd avec 6 cycles aromatiques. Elles étaient aussi capables de dégrader le dibenz[a,h]anthracène et le benzo[a]pyrène mais seulement après croissance sur du pyrène.

Lors des essais effectués avec les divers HAP, nous avons observé une plus grande difficulté de la souche *Sphingomonas* sp. ML1 à dégrader les HAP lourds ayant plus de 4 cycles aromatiques. Nous avons aussi noté une nette préférence de la souche pour le chrysène par rapport aux autres HAP de 4 cycles et ce malgré le fait qu'il soit le moins soluble de tous. Bien que la plus faible solubilité d'un HAP par rapport à un autre (Cerniglia, 1993) où bien la structure du HAP, c'est-à-dire, qu'il soit à angle, en amas ou linéaire peut avoir une influence sur sa dégradation par rapport aux autres HAP ayant le même nombre de cycles (Ye *et al.*, 1996), il semblerait dans notre cas, que le fait d'avoir isolé la souche *Sphingomonas* sp. ML1 en utilisant le chrysène comme principale source de carbone ait eu la plus grande influence sur ses capacités de dégradation des HAP et sa préférence pour le chrysène.

3 Interactions

Plusieurs sortes d'interactions ont été observées dans les cultures qui contenaient du chrysène et un autre HAP. Comme réactions positives, il y a eu un phénomène de synergie avec l'accélération de la dégradation de l'anthracène en présence de chrysène. Ensuite, il y a le co-métabolisme de la plupart des HAP de 5 cycles utilisés sauf le pérylène avec des dégradations allant de 11 à 19 % sans effet sur la dégradation du chrysène. Des effets négatifs ont aussi été observés dans deux cas avec une inhibition de la dégradation du chrysène. Le premier s'est produit dans les cultures contenant du fluoranthène et du chrysène où la présence du chrysène a permis d'obtenir une meilleure dégradation du fluoranthène accompagnée d'une inhibition de la dégradation du chrysène une fois le fluoranthène complètement dégradé. Le second s'est produit en présence de pyrène alors que son co-métabolisme partiel a eu un effet de ralentissement sur la dégradation du chrysène. Dans ces deux cas, il est possible que les inhibitions aient été causées par l'accumulation de métabolites toxiques ou par une inhibition compétitive lors de la dégradation conjointe des HAP. Malgré le fait que ces genres d'interactions aient déjà été démontrées auparavant (Bouchez *et al.*, 1996b), dans notre cas, les données disponibles sont insuffisantes pour pouvoir confirmer le mécanisme précis des inhibitions observées (réversibles ou irréversibles, compétitives ou non-compétitives). Des réactions

neutres ont aussi été observées tels que la dégradation simultanée de deux substrats comme dans les cultures contenant du phénanthrène et du chrysène ou bien l'absence de co-métabolisme du pérylène et du coronène sans inhibition de la dégradation du chrysène.

Parmi les autres chercheurs ayant isolé des souches dégradant le chrysène, Chen et Aitken (1999), Walter *et al.* (1991) et Ye *et al.* (1996) ont aussi démontré plusieurs cas de co-métabolisme de HAP en présence d'un autre HAP plus facilement assimilable. Entre autres, Ye *et al.* (1996), avec la souche *Sphingomonas paucimobilis* EPA505, ont étudié l'effet que la présence du fluoranthène, du benz[*a*]anthracène, du benzo[*b*]fluoranthène, du chrysène et du dibenz[*a,h*]anthracène pouvait avoir sur la dégradation du benzo[*a*]pyrène. Parmi les HAP essayés, seul le benzo[*b*]fluoranthène a eu un effet sur la dégradation du benzo[*a*]pyrène avec une réduction de 30% de sa dégradation. Malgré le fait que ces genres d'interactions aient été rapportés à plusieurs reprises auparavant avec d'autres souches ne pouvant dégrader le chrysène (Grifoll *et al.*, 1995; Tiehm et Fritzsche, 1995; Weissenfels *et al.*, 1991), elles ont été étudiées pour la première fois de façon systématique par Bouchez *et al.* (1995) lors de la dégradation de couples de HAP chez un ensemble de souches. Ils ont ainsi caractérisé huit types de situations différentes. Parmi celles que nous avons observées avec la souche ML1, il y a le co-métabolisme avec ou sans inhibition de la dégradation du HAP substrat, le co-métabolisme avec stimulation de la dégradation, l'absence de co-métabolisme sans inhibitions et la dégradation simultanée des deux substrats. Nous n'avons par contre pas observé de cas d'absence de co-métabolisme avec inhibition ou bien d'antagonisme entre les deux substrats. Contrairement à nous, ils ont aussi observé, de façon générale, que les interactions négatives tels que l'inhibition ou l'antagonisme étaient plus fréquentes que les interactions positives.

4 Voie métabolique de la souche ML1

4.1 Minéralisation du chrysène

Les essais de minéralisation effectués avec la souche ML1 ont démontré qu'elle pouvait minéraliser le chrysène lorsque ce HAP était le seul présent dans la culture. Le

$^{14}\text{CO}_2$ libéré après 15 jours de culture représentait 38 % de la dose initiale de chrysène marqué présent. Ce résultat est un peu plus du double de la valeur obtenue par Chen et Aitken (1999) avec la souche *Pseudomonas saccharophila* P15 lorsque le chrysène était la seule source de carbone mais il est semblable aux résultats qu'ils ont obtenus après induction de leur souche par croissance préalable sur du phénanthrène ou du salicylate. Ye *et al.* (1996) ont aussi démontré la capacité de la souche *Sphingomonas paucimobilis* à minéraliser jusqu'à 42 % du chrysène présent par co-métabolisme lorsqu'en présence de fluoranthène. Aucune tentative de minéralisation n'a été effectuée avec les autres souches dégradant le chrysène (Caldini *et al.*, 1995; Mueller *et al.*, 1990).

4.2 Cinétique de dégradation

Les essais effectués pour déterminer la cinétique de dégradation de la souche ML1 ont confirmé qu'il y avait croissance de cette dernière sur le chrysène. La courbe de croissance nous révèle que la souche ML1 est en phase de croissance exponentielle pendant les 7 premiers jours suivie d'un plafonnement et maintien du compte bactérien par la suite. Il est intéressant de noter que le plafonnement dans la courbe de croissance est survenu avant l'arrêt dans la dégradation du chrysène et que par la suite au moins 33% du chrysène présent a été dégradé sans qu'il y ait augmentation de la population bactérienne. Sachant que la souche ML1 est capable de minéraliser le chrysène et qu'il ne semble pas y avoir d'accumulation détectable d'intermédiaires de dégradation dans les cultures (voir section 5.3) le chrysène doit forcément avoir été assimilé pour la croissance des cellules. Une explication probable est que le plafonnement observé soit dû à l'utilisation de cultures biphasiques et à la prise des échantillons à partir de la phase liquide plutôt qu'à un arrêt de croissance de la souche ML1. Dans les cultures biphasiques, la majeure partie du chrysène se trouve dissout dans la phase hydrophobe et le brassage de ce dernier crée une suspension de petites gouttelettes d'huile dans la phase aqueuse. Cette suspension a pour effet d'augmenter la surface de contact disponible pour les micro-organismes présents dans la phase aqueuse et du même coup permettre une meilleure dégradation du chrysène. Il est donc possible qu'une bonne partie de la croissance bactérienne se produise à l'interface entre les gouttelettes d'huile en suspension et la phase aqueuse. Ainsi, la prise d'un échantillon de la phase aqueuse,

même après brassage vigoureux du milieu de culture, aurait pour effet de sous-estimer le nombre réel de micro-organismes présents.

L'autre aspect à discuter est le ralentissement et l'arrêt de la dégradation du chrysène avec un résiduel de 33% et ce malgré la présence de la souche ML1 en grand nombre. Bien que de légers résiduels de chrysène aient déjà été observés dans les cultures biphasiques standards (avec sol ou extrait aqueux de sol), ils n'ont jamais été aussi élevés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces essais ont été effectués dans des milieux de culture biphasiques sans sol et inoculés avec une culture activée et fortement diluée de la souche ML1. L'arrêt dans la dégradation du chrysène observé serait probablement le résultat d'une perte d'activation de la souche ML1 (voir section 6 sur l'activation de la voie catabolique du chrysène).

4.3 Intermédiaires de dégradation

Plusieurs tentatives d'identification des intermédiaires de dégradation du chrysène ont été effectuées au courant de cette maîtrise en variant les conditions de culture, les méthodes d'extraction et les méthodes d'analyse. Malgré le fait que des intermédiaires de dégradation ont été détectés en faible quantité, ils n'ont pu être identifiés. Une revue des écrits scientifiques a révélé qu'aucun mécanisme précis de dégradation bactérienne du chrysène n'a encore été proposé à ce jour par les chercheurs ayant isolé des souches dégradant le chrysène (Caldini *et al.*, 1995; Chen et Aitken, 1999; Walter *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1996). Le chrysène étant un HAP lourd très peu soluble, l'étape limitante de sa dégradation par les micro-organismes est probablement l'attaque initiale par les oxygénases. Une fois le HAP hydroxylé, il est fort probable que la plus grande solubilité de l'intermédiaire le rende plus facilement assimilable par les micro-organismes. La très faible concentration de ces intermédiaires serait donc le résultat de leur consommation rapide par les micro-organismes. Ceci pourrait expliquer en partie les difficultés que nous avons rencontrées dans la mise en évidence des intermédiaires de dégradation.

4.4 Gènes cataboliques

Il est connu que certaines étapes enzymatiques impliquées dans la décomposition du phénanthrène jusqu'au salicylate ressemblent à ceux de la voie catabolique supérieure

du naphthalène et que des enzymes communes sont impliquées (Iwabuchi et Harayama, 1997). En effet, jusqu'à 90% d'homologie a été démontrée chez différentes souches entre la séquence des gènes codant pour certaines des enzymes utilisées pour la dégradation du phénanthrène et du naphthalène. Nous avons donc tenté de détecter chez la souche ML1 la présence de gènes associés à la dégradation des HAP en utilisant des amorces spécifiques codant pour les gènes de la voie catabolique supérieure du naphthalène chez la souche *Pseudomonas putida* G7 (Dagher *et al.*, 1997) et présents chez d'autres souches dégradant les HAP.

Dans notre cas, aucune des amorces utilisées n'a permis d'obtenir de signal lors des essais d'amplification par PCR où l'ADN génomique extrait de la souche ML1 était utilisé. Malgré le fait que de faibles amplifications aient été observées à 50°C, nous assumons qu'elles sont non-spécifiques puisqu'elles ne correspondent pas aux poids moléculaires attendus. Puisque nous savons que la souche ML1 dégrade les HAP et qu'une amplification a été obtenue avec l'ADN génomique de la souche témoin (*Sphingomonas* sp. 19R), quelques hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'amplification de l'ADN chez la souche ML1. La première est que la souche ML1 utilise la même voie catabolique pour la dégradation du naphthalène jusqu'au salicylate présente chez la souche *Pseudomonas putida* G7 mais que la régulation et les enzymes impliquées sont différentes. La spécificité des amorces utilisées serait alors trop étroite pour permettre l'amplification des gènes nécessaires à la dégradation du chrysène chez la souche ML1. Cette dernière hypothèse a déjà été utilisée pour expliquer une absence d'hybridation chez la souche *Comamonas testosteroni* avec une amorce spécifique codant pour l'opéron *nah* de la voie catabolique supérieure du naphthalène (Goyal et Zystral, 1996). Même si la souche pouvait dégrader le naphthalène, l'anthracène et le phénanthrène et que la voie catabolique était similaire à celle des *Pseudomonas*, il y avait peu d'homologie entre les gènes impliqués et aucune hybridation de l'amorce n'a été observée. L'autre hypothèse est que la souche ML1 utilise une voie catabolique différente pour la dégradation des HAP que celles rapportées dans les écrits scientifiques et par conséquent aucune amplification ne peut être observée avec les amorces utilisés puisque les gènes pour lesquels ils codent sont différents. Étant donné que nous sommes les seuls à avoir isolé une souche pouvant dégrader des quantités significatives de

chrysène lorsque présent comme seule source de carbone et qu'aucune tentative pour identifier les gènes impliqués dans la dégradation du chrysène n'a été effectuée par les autres chercheurs ayant isolé des souches, nous ne pouvons comparer nos résultats et tenter d'arriver à une réponse plus claire. Des travaux additionnels seront donc nécessaires dans le but de déterminer si la souche ML1 a un agencement différent des gènes de dégradation par rapport aux *Pseudomonas* ou si elle utilise une voie catabolique différente de celles rapportées dans la littérature.

5 Activation de la voie catabolique du chrysène

Les essais préliminaires effectués lors de la mise au point des cultures biphasiques avaient établi que la vitesse de dégradation du chrysène était plus rapide lorsque de petites quantités de sol non contaminé étaient ajoutées aux milieux de culture. Pour cette raison, l'isolement de la souche ML1 ainsi que l'identification de son spectre d'activité ont été effectués dans des cultures biphasiques contenant une petite quantité de sol ainsi que le ou les HAP appropriés comme source principale de carbone. Une fois la souche ML1 isolée, des essais ont été effectués pour préciser le rôle du sol et la nature des composés responsables de l'effet positif. Pour ce faire, différentes cultures ont été préparées avec une variété d'ajouts minéraux ou organiques ainsi que divers extraits de sol. Ces essais ont confirmé que la dégradation du chrysène était plus rapide en présence de sol ou d'un extrait aqueux de sol et que c'est la fraction organique du sol qui en était responsable. Dans les cultures effectuées en absence de sol ou d'un extrait de sol, peu ou pas de dégradation du chrysène a été observée à l'exception des cultures contenant des ajouts de vitamines et de minéraux en trace. De plus, une pré-incubation de 4 heures de la souche *Sphingomonas* sp. ML1 en présence d'un extrait aqueux de sol a été suffisante pour qu'il y ait dégradation du chrysène dans les cultures biphasiques sans sol. La première hypothèse pour expliquer ces résultats est que le chrysène n'induit pas la synthèse des enzymes nécessaires à sa dégradation. Ce serait plutôt un autre composé organique présent dans le sol non contaminé qui serait responsable de l'activation des gènes codant pour ces enzymes. La seconde hypothèse est que le chrysène peut induire la synthèse des enzymes nécessaires à sa dégradation mais que la présence d'un co-facteur est nécessaire pour permettre sa dégradation par la souche ML1. Cette dernière

hypothèse pourrait expliquer pourquoi de légères dégradations du chrysène dépassant rarement les 30 % ont été observées lors de certains tests avec des cultures biphasiques sans sol puisque les enzymes nécessaires à la dégradation du chrysène étaient induites mais l'absence du co-facteur a empêché sa dégradation complète. La dégradation du chrysène qui a été obtenue dans les cultures biphasiques sans sol contenant des ajouts de minéraux en trace et de vitamines tend aussi à pointer dans ce même sens. D'autres études devront cependant être effectuées afin de pouvoir déterminer de façon plus précise laquelle de ces hypothèses est exacte.

Dans les écrits scientifiques, la nécessité d'utiliser un HAP plus facilement assimilable ou une autre source de carbone pour induire la synthèse des enzymes nécessaires à la dégradation de certains HAP lourds a déjà été rapportée à maintes reprises (Bouchez *et al.*, 1995; Juhasz *et al.*, 1997b; Kanaly, 2000). Par contre, à notre connaissance, il s'agit d'une première pour ce qui est de la nécessité d'ajouter une fraction de sol non-contaminé pour obtenir une activation de la dégradation d'un HAP.

6 Composé responsable de l'activation de la dégradation du chrysène

L'adsorption de la fraction organique d'un sol non-contaminé sur du charbon activé, suivi d'un lavage avec du méthanol a permis d'isoler les composés responsables de l'activation de la dégradation du chrysène. L'efficacité de la fraction organique a été vérifiée en l'ajoutant à des cultures biphasiques sans sol et elle s'est avérée comparable aux résultats de dégradation obtenus avec l'extrait aqueux de sol. Une analyse par GC-MS a révélé une forte homologie des composés inconnus aux sucres et plus particulièrement aux disaccharide. Cependant, la comparaison de la signature du spectre de masse du composé majeure avec celles contenues dans une banque de données informatiques de 60000 produits n'a pas permis d'obtenir une homologie de 100% et donc l'identité exacte du disaccharide reste à confirmer.

Une hypothèse est que le disaccharide isolé du sol proviendrait de la dégradation des hémicelluloses qui sont des polysaccharides que l'on retrouve naturellement dans l'environnement et qui sont produits par les végétaux lors de la formation de leurs

membranes cellulaires. Les hémicelluloses, la cellulose et la lignine, communément appelés lignocelluloses, sont étroitement liées entre elles pour former le bois (Chahal, 1994). La lignine est le composé aromatique le plus abondant dans la nature et est dégradée à l'aide d'une combinaison d'enzymes produites par les champignons et les bactéries (Massai *et al.*, 1999). Les champignons sont responsables de l'attaque initiale avec la sécrétion de peroxydases et de laccases, alors que les bactéries sont responsables de la dégradation et minéralisation des fragments de lignines restants (Massai *et al.*, 1999). Il apparaît donc possible que les mécanismes enzymatiques utilisés par la souche ML1 pour dégrader les HAP puissent avoir évolué d'une capacité à dégrader les composés aromatiques de la lignine présents dans les cellules végétales. Puisque les hémicelluloses sont étroitement liées à la lignine, il est envisageable que la présence de sous-produits de dégradation tel que des disaccharides puissent servir d'inducteur ou de co-facteur pour l'activation des enzymes nécessaires à la dégradation de la lignine et du même coup, permettre la dégradation des HAP chez la souche ML1. D'autres études devront bien sûr être effectuées pour confirmer cette hypothèse.

CONCLUSION

Les divers essais effectués au cours de ce travail de recherche ont permis de démontrer l'efficacité du système biphasique comme outil pour isoler et étudier des micro-organismes dégradant les HAP lourds. À l'aide de cultures biphasiques, nous sommes les premiers à être parvenus à isoler une souche bactérienne, *Sphingomonas* sp. ML1, d'un sol contaminé aux hydrocarbures, par croissance sur du chrysène comme source principale de carbone. Plusieurs séries de cultures biphasiques effectuées avec la souche ML1 ont démontré qu'en plus du chrysène, la souche pouvait facilement dégrader les HAP ayant de 3 à 4 cycles aromatiques et co-métaboliser plusieurs autres HAP ayant 5 cycles aromatiques en présence de chrysène. La comparaison du taux de dégradation du chrysène ainsi que du spectre de dégradation des autres HAP par la souche ML1 avec ceux cités dans les écrits scientifiques, nous révèle que la souche ML1 se trouve parmi les plus efficaces pour la dégradation du chrysène et qu'elle possède un spectre de dégradation assez large. Un autre aspect intéressant observé au cours des travaux de maîtrise est l'importance d'ajouter une fraction de sol non-contaminé pour activer la voie de dégradation du chrysène chez la souche ML1. Divers essais effectués pour tenter d'isoler le composé responsable de cette activation ont confirmé qu'il s'agissait d'un composé organique du sol. Des analyses au GC-MS de la fraction organique ont permis d'identifier le composé majeur comme étant un disaccharide.

Comme recherche future, d'autres études devront être effectuées afin d'identifier de façon plus précise le disaccharide en question et vérifier si ce dernier est capable d'activer les voies de dégradation du chrysène. L'identification d'un tel composé, capable d'activer les voies de dégradation des HAP, serait d'un intérêt significatif pour l'amélioration des traitements de bioremédiation des sols. De plus, puisque tous les essais de dégradation des HAP ont été effectués en présence de sol, il serait intéressant de vérifier si le sol est nécessaire pour activer la dégradation des HAP ayant moins de 4 cycles aromatiques comme c'est le cas pour le chrysène. Enfin, devant notre insuccès à identifier des intermédiaires de dégradation du chrysène ainsi que les gènes responsables et avec l'absence de telles informations dans les écrits scientifiques, des recherches plus

poussées dans le but de les identifier devraient être effectuées afin de pouvoir approfondir les connaissances déjà existantes sur les mécanismes de biodégradation des HAP lourds par les bactéries.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, B. E., et T. Henrysson. 1996. «Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 46, p. 647-652.
- ASCON-CABERA, M., et J.-M. Lebeault. 1993. «Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system». Appl. Environ. Microbiol., vol. 59, no. 6, p. 1717-1724.
- ATLAS, R. M. 1981. «Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective». Microbiol. Rev., vol. 45, no. 1, p. 180-209.
- ATLAS, R. M., et C. E. Cerniglia. 1995. «Bioremediation of petroleum pollutants». BioScience, vol. 45, no. 5, p. 332-338.
- BALKWILL, D. L., G. R. Drake, R. H. Reeves, J. K. Fredrickson, D. C. White, D. B. Ringelberd, D. P. Chandler, M. F. Romine, D. W. Kennedy, C. M. Spadoni 1997. «Taxonomic study of aromatic-degrading bacteria from deep-terrestrial-subsurface sediments and description of *Sphingomonas aromaticovorans* sp. nov., *Sphingomonas subterranea* sp. nov., and *Sphingomonas stygia* sp. nov.». Int. J. Syst. Bacteriol., vol. 47, no. 1, p. 191-201.
- BARCLAY, C. D., G. F. Farquhar et R. L. Legge. 1995. «Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*». Appl. Microbiol. Biotechnol., 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». Appl. Environ. Microbiol., vol. 65, p. 2697-2702.

- BARNSELY, E. A. 1975. «The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene». Can. J. Microbiol., vol. 21, p. 1004-1008.
- BEAULIEU, M., et R. Drouin. 1998. Politique de protection des sols et de réhabilitation des terrains contaminés: Les Publications du Québec, 124 p.
- BEZALEL, L., Y. Hadar, P. P. Fu, J. P. Freeman et C. E. Cerniglia. 1996. «Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*». Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, p. 2554-2559.
- BLUMER, M. 1976. «Polycyclic aromatic compounds in nature». Scientific American, vol. 234, p. 34-45.
- BOETHLING, R. S. 1984. «Biodegradation testing of insoluble chemicals». Environ. Toxicol. Chem., vol. 3, p. 5-7.
- BOONCHAN, S., M. L. Britz et G. A. Stanley. 2000. «Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures». Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, no. 3, p. 1007-1019.
- BOSSERT, I., W. Kachel et R. Bartha. 1984. «Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil». Appl. Environ. Microbiol., vol. 47, no. 4, p. 763-767.
- BOSSERT, I. D., et R. Bartha. 1986. «Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil». Bull. Environ. Contam. Toxicol., vol. 37, p. 490-495.
- BOUCHEZ, M., D. Blanchet, F. Haeseler et J.-P. Vandecasteele. 1996a. «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Première partie:

- propriétés, origines, devenir». Revue de l'Institut français du pétrole, vol. 51, no. 3, p. 407-419.
- BOUCHEZ, M., D. Blanchet, F. Haeseler et J.-P. Vandecasteele. 1996b. «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement. Deuxième partie: la dégradation par voie microbienne». Revue de l'Institut français du pétrole, vol. 51, no. 6, p. 797-828.
- BOUCHEZ, M., D. Blanchet et J.-P. Vandecasteele. 1995. «Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 43, p. 156-164.
- BRODKORB, T. S., et R. L. Legge. 1992. «Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*». Appl. Environ. Microbiol., vol. 58, p. 3117-3121.
- BULLOCK, W. O., J. M. Fernandez et J. M. Short. 1987. «XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection.». BioTechniques, vol. 5, p. 376.
- BUMPUS, J. A. 1989. «Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*». Appl. Environ. Microbiol., vol. 55, p. 154-158.
- 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». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 44, p. 225-229.
- CERNIGLIA, C. E. 1984. «Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons» In Advances in Applied Microbiology, vol. 30, p. 31-71. Academic Press, Inc.

CERNIGLIA, C. E. 1992. «Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons». Biodegradation, vol. 3, p. 351-368.

CERNIGLIA, C. E. 1993. «Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons». Curr. Opin. Biotechnol., vol. 4, p. 331-338.

CERNIGLIA, C. E., D. T. Gibson et R. H. Dodge. 1994. «Metabolism of benz[a]anthracene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*». Appl. Environ. Microbiol., vol. 60, no. 11, p. 3931-3938.

CERNIGLIA, C. E., et M. A. Heitkamp. 1989. «Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment». In Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, Boca Raton, Fla.: CRC Press, p. 41-68.

CERNIGLIA, C. E., J. B. Sutherland et S. A. Crow. 1992. «Fungal Metabolism of Aromatic Hydrocarbons». In Microbial degradation of Naturel Products, p. 193-217.

CHAHAL, D. S. 1994. «Biological disposal of lignocellulosic wastes and alleviation of their toxic effluent». In Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals, p. 364-385. Portland: Dioscorides Press.

CHEN, S., et M. D. Aitken. 1999. «Salicylate stimulates the degradation of hight molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophilia* P15». Environ. Sci. Technol., vol. 33, p. 435-439.

COLLINS, L. D., et A. J. Daugulis. 1997a. «Biodegradation of phenol at high initial concentrations in two-phase partitioning batch and fed-batch bioreactors». Biotechnol. Bioeng., vol. 55, no. 1, p. 155-162.

COLLINS, L. D., et A. J. Daugulis. 1997b. «Characterization and optimisation of a two-phase partitioning bioreactor for the biodegradation of phenol». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 48, p. 18-22.

COLLINS, L. D., et A. J. Daugulis. 1999a. «Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part 1. Solvant selection and toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 52, p. 354-359.

COLLINS, L. D., et A. J. Daugulis. 1999b. «Benzene/toluene/p-xylene degradation. Part 2. Effect of substrate interactions and feeding strategies in toluene/benzene and toluene/p-xylene fermentations in a partitioning bioreactor». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 52, p. 360-365.

COLLINS, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field et A. D. W. Dobson. 1996. «Oxidation of anthracene and benzo[a]pyrene by laccases from *Trametes versicolor*». Apl. Environ. Microbiol., vol. 62, p. 4563-4567.

CRUICKSHANK, S. M., A. J. Daugulis et M. P. J. 2000a. «Dynamic modeling and optimal fed-batch feeding strategies for a two-phase partitioning bioreactor». Biotechnology and bioengineering, vol. 67, no. 2, p. 224-233.

CRUICKSHANK, S. M., A. J. Daugulis et M. P. J. 2000b. «Modelling of a continuous two-phase partitioning bioreactor for the degradation of xenobiotics». Process Biochemistry, vol. 35, p. 1027-1035.

CUTRIGHT, T. J., et S. Lee. 1994. «Microorganisms & metabolic pathways for remediation of PAH contaminated soil». Fresenius Envir. Bull., vol. 3, p. 413-421.

DAGHER, F., E. Déziel, P. Lirette, G. Paquette, J.-G. Bisailon et R. Villemur. 1997. «Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacterial strains isolated from contaminated soils». Can. J. Microbiol., vol. 43, p. 368-377.

DEEN-ROSS, D., et C. E. Cerniglia. 1996. «Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 46, p. 307-312.

DEZIEL, E. 1997. «Impact des micro-organismes sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques». Projet de recherche pour doctorat. École Polytechnique et Institut Armand Frappier, 49 p.

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

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». Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, no. 6, p. 1908-1912.

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.

GIBSON, D. T., V. Mahadevan, D. M. Jerina, H. Yagi et H. J. C. Yeh. 1975. «Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium». Science, vol. 189, p. 295-297.

GOYAL, A. K., et G. J. Zylstra. 1996. «Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39». Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, no. 1, p. 230-236.

GRIFOLL, M., S. A. Selifonov et P. J. Chapman. 1995. «Transformation of substituted fluorenes and fluorene analogs by *Pseudomonas* sp. strain F274». Appl. Environ. Microbiol., vol. 61, no. 9, p. 3490-3493.

- GRIMBERG, S. J., M. D. Aitken et W. T. Stringfellow. 1994. «The influence of a surfactant on the rate of phenanthrene mass transfer into water». Wat. Sci. Tech., vol. 30, no. 7, p. 23-30.
- GROSSER, R. J., D. Warshawsky et J. R. Vestal. 1991. «Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils». Appl. Environ. Microbiol., vol. 57, no. 12, p. 3462-3469.
- HARVEY, R. G. 1997. «Polycyclic aromatic hydrocarbons». Wiley-VHC. New York, N.Y.
- HEITKAMP, M. A., et C. E. Cerniglia. 1987. «Effects of chemical structure and exposure on the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater and estuarine ecosystems». Environ. Toxicol. Chem., vol. 6, p. 535-546.
- HEITKAMP, M. A., et C. E. Cerniglia. 1988a. «Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field». Appl. Environ. Microbiol., vol. 54, no. 6, p. 1612-1614.
- HEITKAMP, M. A., W. Franklin et C. E. Cerniglia. 1988b. «Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium». Appl. Environ. Microbiol., vol. 54, no. 10, p. 2549-2555.
- HEITKAMP, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller et C. E. Cerniglia. 1988c. «Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products». Appl. Environ. Microbiol., vol. 54, no. 10, p. 2556-2565.
- INOUE, A., et K. Horikoshi. 1991. «Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P». J. Ferment. Bioeng., vol. 71, no. 3, p. 194-196.

- JIMENEZ, I., et R. Bartha. 1996. «Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp.». Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, no. 7, p. 2311-2316.
- JUHASZ, A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley. 1996. «Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*». Biotechnol. Lett., vol. 18, no. 5, p. 577-582.
- JUHASZ, A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley. 1997a. «Degradation of benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene and coronene by *Burkholderia cepacia*». Wat. Sci. Tech., vol. 36, no. 10, p. 45-51.
- JUHASZ, A. L., M. L. Britz et G. A. Stanley. 1997b. «Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*». J. Appl. Microbiol., vol. 83, p. 189-198.
- JUHASZ, A. L., G. A. Stanley et M. L. Britz. 2000. «Microbial degradation and detoxification of high molecular weight aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003». Appl. Environ. Microbiol., vol. 30, p. 396-401.
- KANALY, R. A. 2000. «Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria». J. Bacteriol., vol. 182, no. 8, p. 2059-2067.
- 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)». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 41, p. 267-273.
- KEITH, L. H., et W. A. Telliard. 1979. «Priority pollutants. I-a perspective view.». Environ. Sci. Technol., vol. 13, no. 4, p. 416-423.

KELLEY, I., J. P. Freeman, F. E. Evans et C. E. Cerniglia. 1991. «Identification of a carboxylic acid metabolite from the catabolism of fluoranthene by a *Mycobacterium* sp.». Appl. Environ. Microbiol., vol. 57, no. 3, p. 636-641.

KIEHLMANN, E., L. Pinto et M. Moore. 1996. «The transformation of chrysene to trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene by filamentous fungi». Can. J. Microbiol., vol. 42, p. 604-608.

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.

LAUREN, L., L. Pinto, C. Wiebe, E. Kiehlman et M. Moore. 1995. «The oxydation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi». Can. J. Microbiol., vol. 41, p. 477-488.

LEAHY, J. G., et R. R. Colwell. 1990. «Microbial degradation of hydrocarbons in the environment». Microbiol. Rev., vol. 54, p. 305-315.

MAHAFFEY, W. R., D. T. Gibson et C. E. Cerniglia. 1988. «Bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene». Appl. Environ. Microbiol., vol. 54, p. 2415-2423.

MARCOUX, J., E. Déziel, R. Villemur, F. Lépine, J.-G. Bisailon et R. Beaudet. 2000. «Optimization of hight-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in a two-liquid-phase bioreactor». J. Appl. Micro., vol. 88, p. 655-662.

MASSAI, E., Y. Katayama, S. Nishikawa et M. Fukoda. 1999. «Characterization of *Sphingomonas paucimibilis* SYK-6 genes involved in degradation of lignin-related compounds». J. Ind. Micro. Biotech., vol. 23, p. 364-373.

MEEK, M. E., P. K. L. Chan et S. Bartlett. 1994. «Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada». Environ. Carcino. Ecotox. Revs., vol. 12, p. 443-452.

MENN, F. M., B. M. Applegate et G. S. Sayler. 1993. «NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids». Appl. Environ. Microbiol., vol. 59, p. 1938-1942.

MORGAN, P., et R. J. Watkinson. 1989. «Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment». CRC Crit. Rev. Biotechnol., vol. 8, no. 4, p. 305-333.

MUELLER, J. G., P. J. Chapman, B. O. Blattman et P. H. Pritchard. 1990. «Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*». Appl. Environ. Microbiol., vol. 56, no. 4, p. 1079-1086.

MUELLER, J. G., P. J. Chapman et P. H. Pritchard. 1989. «Action of a Fluoranthene-Utilizing Bacterial Community on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Components of Creosote». Appl. Environ. Microbiol., vol. 55, no. 12, p. 3085-3090.

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». Appl. Environ. Microbiol., vol. 60, no. 7, p. 2643-2646.

POTHULURI, J. V., A. Selby, F. E. Evans, J. P. Freeman et C. E. Cerniglia. 1994. «Transformation of chrysene and other polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by the fungus *Cunninghamella elegans*». Can. J. Bot., vol. 73, p. 1025-1033.

PROVIDENTI, M. A., C. A. Flemming, H. Lee et J. T. Trevors. 1995. «Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries». FEMS Microbiol. Ecol., vol. 17, p. 15-26.

- REHMANN, K., H. P. Noll, C. E. Steinberg et A. A. Kettrup. 1998. «Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. KR2». Chemosphere, vol. 36, p. 1717-1725.
- REZESSY-SZABO, J. M., G. N. M. Huijberts et J. A. M. de Bont. 1987. «Potential of organic solvents in cultivating micro-organisms on toxic water-insoluble compounds». In Biocatalysis in organic media, Amsterdam: Elsevier Science, p. 295-302.
- SAMBROOK, J., E. F. Fritsch et T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Press.
- SAMSON, R. 1994a. «Biorestauration des sites contaminés: les technologies *in situ*». Dans: La filière biomasse, Rapport du centre québécois de valorisation de la biomasse. 19 p.
- SAMSON, R. 1994b. «Biorestauration des sites contaminés: les technologies *ex situ*». Dans: La filière biomasse, Rapport du centre québécois de valorisation de la biomasse. 12 p.
- SANGLARD, D., M. S. A. Leisola et A. Fietchter. 1986. «Role of extracellular ligninase in biodegradation of benzo[a]pyrene by *Phanerochaete chrysosporium*». Enzyme. Microb. Technol., vol. 8, p. 209-212.
- SCHNEIDER, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue et D. Warshawsky. 1996. «Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site». Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, no. 1, p. 13-19.
- SHUTTLEWORTH, K. L., et C. E. Cerniglia. 1995. «Environmental aspects of PAH biodegradation». Appl. Biochem. Biotech., vol. 54, p. 291-302.

SIMS, R. C., et M. R. Overcash. 1983. «Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAS) in soil-plant systems». Residue Rev., vol. 88, p. 1-68.

SINGLETON, I. 1994. «Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research». J. Chem. Tech. Biotechnol., vol. 59, p. 9-23.

SUTHERLAND, J. B. 1992. «Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi». J. Ind. Microbiol., 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, Wiley-Liss, p. 269-306.

THIBAUT, S. L., M. Anderson et W. T. Frankenberger. 1996. «Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils». Appl. Environ. Microbiol., vol. 62, no. 1, p. 283-287.

THIEM, A., et C. Fritzsche. 1995. «Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp.». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 42, p. 964-968.

TREZESICKA-MLYNARZ, D., et O. P. Ward. 1995. «Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from a PAH-contaminated soil». Can. J. Microbiol., vol. 41, p. 470-476.

TSOMIDES, H. J., J. B. Hughes, J. M. Thomas et C. H. Ward. 1995. «Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments». Environ. Toxicol. Chem., vol. 14, no. 6, p. 953-959.

- 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. Battelle Press, p. 55-62.
- VERMUE, M., J. Sikkema, A. Verheul, R. Baker et J. Tramper. 1993. «Toxicity of homologous series of organic solvents for the gram-positive bacteria *Arthrobacter* and *Nocardia* sp. and the gram-negative bacteria *Acinetobacter* and *Pseudomonas* sp.». Biotechnol. Bioeng., vol. 42, p. 747-758.
- VILLEMUR, R., E. Deziel, A. Benachenhou, J. Marcoux et E. Gauthier. 2000. «Two-Liquid-Phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil». Biotech. Prog., vol. 16, p. 966-972.
- VOGT, N. B., F. Brakstad, K. Thrane, S. Nordenson, J. Krane, E. Aamot, K. Koiset, K. Esbenson et E. Steinnes. 1987. «Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and air: statistical analysis and classification by SICMA method». Environ. Sci. Technol., vol. 21, p. 35-44.
- VOLKERING, F., A. M. Breure, J. G. Van Andel et W. H. Rulkens. 1995. «Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons». Appl. Environ. Microbiol., vol. 61, no. 5, p. 1699-1705.
- VYAS, B. R. M., S. Bakowski, V. Sasek et M. Matucha. 1994. «Degradation of anthracene by selected white rot fungi». FEMS Microbiol. Ecol., vol. 14, p. 65-70.
- WALKER, J. D., et R. R. Colwell. 1976. «Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria». Appl. Environ. Microbiol., vol. 31, p. 189-197.
- WALTER, U., M. Beyer, J. Klein et H.-J. Rehm. 1991. «Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1». Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 34, p. 671-676.