

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN  
MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

ÉRIC DÉZIEL

ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS PAR  
DES SOUCHES BACTÉRIENNES MÉTABOLISANT LES  
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

MAI 1996

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
ABRÉVIATIONS.....	xiii
SOMMAIRE.....	xiv
INTRODUCTION.....	2
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
1. Introduction.....	6
2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	6
2.1. Origines (sources).....	6
2.2. Structures.....	6
2.3. Caractéristiques.....	7
3. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	7
3.1. Micro-organismes.....	7
3.2. Mécanismes enzymatiques et voies métaboliques.....	14
3.3. Génétique et régulation.....	15
4. Restauration de sites contaminés.....	20
4.1. Technologies physico-chimiques.....	20
4.2. Technologies biologiques.....	21
4.2.1. Méthodes de bio-traitement.....	21
4.2.1.1. <i>In situ</i> .....	21
4.2.1.2. <i>Ex situ</i> .....	21
4.2.1.3. Bioréacteurs.....	22
4.2.2. Paramètres importants.....	22
4.2.2.1. Présence de micro-organismes adaptés.....	22
4.2.2.2. Conditions environnementales.....	22
4.2.2.3. Biodisponibilité du substrat.....	23
5. Biodisponibilité.....	24
5.1. Hydro-solubilité et vitesse de dissolution.....	25
5.2. Sorption et vitesse de désorption.....	26
6. Surfactants.....	32
6.1. Structures et catégories.....	32
6.2. Caractéristiques.....	32
6.2.1. Concentration micellaire critique (CMC).....	33
6.2.2. Tension superficielle.....	38
6.2.3. Équilibre hydrophile-lipophile (EHL).....	38
6.3. Augmentation de la biodisponibilité et dégradation des substrats inaccessibles.....	38
6.3.1. Mécanismes.....	39
6.3.2. Modèle et hypothèses.....	40
6.3.3. Travaux expérimentaux et applications.....	43
6.3.4. Inconvénients.....	44

7. Biosurfactants.....	45
7.1. Définition et classification.....	46
7.2. Exemples de micro-organismes producteurs.....	47
7.2.1. Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
7.3. Caractéristiques.....	53
7.3.1. Générales.....	53
7.3.2. Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	54
7.4. Biosynthèse.....	54
7.4.1. Conditions.....	56
7.4.2. Voie biosynthétique: génétique et régulation.....	57
7.4.2.1. Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	57
7.5. Rôle physiologique.....	63
7.5.1. Production de biosurfactants vs assimilation de substrats peu biodisponibles.....	63
7.5.2. Mécanismes d'action.....	64
7.6. Applications.....	65
7.6.1. «Microbially-Enhanced Oil Recovery» (MEOR).....	66
7.6.2. Biodégradation des hydrocarbures.....	67
7.6.2.1. Addition de biosurfactants.....	67
7.6.2.2. Ensemencement avec souche productrice.....	67
8. Conclusion.....	68
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE.....	70
1. Hypothèses.....	71
2. Objectifs.....	71
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	72
1. Produits chimiques et milieux de culture.....	73
2. Micro-organismes .....	74
2.1. Souches Thouin.....	74
2.2. Isolats et souches BDP.....	75
2.3. Souches de référence UG2 et PG201.....	75
2.4. Conservation des souches et isolats.....	76
3. Identification des souches microbienne dégradant des HAP.....	76
3.1. Souches de la Sablière Thouin.....	76
3.2. Souches BDP.....	78
4. Criblage des isolats bactériens pour leur capacité à dégrader les HAP.....	78
4.1. Étude préliminaire en milieu liquide.....	78
4.2. Criblage sur milieu solide.....	78
4.2.1. Volatilisation du substrat.....	78
4.2.2. Méthode par pulvérisation des HAP.....	79
4.2.3. Détection de la naphtalène dioxygénase.....	80
5. Confirmation de la biodégradation des HAP.....	83
5.1. Tests sur géloses.....	83
5.1.1. Recherche de métabolites de la dégradation.....	83
5.1.2. Étude de l'induction des gènes responsables de la dégradation du naphtalène.....	83
5.2. Tests en cultures liquides.....	84
5.2.1. Procédure.....	84
5.2.2. Extraction et dosage chimique par chromatographie en phase gazeuse.....	85
5.2.3. Optimisation de la biodégradation.....	86
6. Étude de la capacité à produire des biosurfactants ou bioémulsifiants.....	86

6.1. Méthodes indirectes (activité des biosurfactants).....	86
6.1.1. «Drop Collapsing Test».....	86
6.1.2. Tensiométrie.....	87
6.1.3. Formation et stabilité d'émulsions.....	87
6.2. Méthodes directes (présence des biosurfactants).....	88
6.2.1. Géloses bleues Siegmund-Wagner (SW).....	88
6.2.2. Dosage des rhamnolipides.....	88
6.3. Production de biosurfactants avec substrats solubles.....	89
6.3.1. Essai avec sucrose pour souches négatives.....	89
6.3.2. Extraction des biosurfactants.....	90
6.4. Production de biosurfactants ou bioémulsifiants à partir d'un HAP.....	90
6.4.1. Études préliminaires.....	90
6.4.2. Cinétique de la production de rhamnolipides avec le naphthalène...90	
6.4.2.1. Estimation de la quantité d'intermédiaires de la dégradation du naphthalène.....	91
6.4.2.2. Evaluation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire.....	91
6.4.2.3. Mesure de la solubilité apparente du naphthalène.....	91
RÉSULTATS.....	93
1. Micro-organismes.....	94
1.1. Liste des isolats bactériens de la Sablière Thouin.....	94
1.2. Isolats BDP.....	94
2. Dégradation des HAP: criblage des isolats bactériens.....	95
2.1. Essai préliminaire.....	95
2.2. Criblage sur milieu solide.....	98
2.2.1. Souches de la Sablière Thouin.....	98
2.2.2. Isolats BDP.....	99
2.2.3. Conversion de l'indole en indigo.....	101
2.2.3.1. Induction de la naphthalène dioxygénase par les HAP...101	
2.2.3.2. Effet de la concentration d'indole.....	102
3. Identification des souches dégradant des HAP.....	108
3.1. Souches Thouin.....	108
3.2. Isolats et souches BDP.....	108
4. Étude de la biodégradation des HAP.....	112
4.1. Expériences en milieux solides.....	112
4.1.1. Recherche des métabolites dans la gélose.....	112
4.1.2. Addition de salicylate de sodium.....	112
4.1.2.1. Analyses préliminaires.....	112
4.1.2.2. Comparaison de l'effet du salicylate avec le naphthalène et l'acide hydroxy-naphtoïque.....	113
4.1.2.3. Détermination de la concentration optimale de salicylate.....	114
4.2. Expériences en cultures liquides.....	117
4.2.1. Expériences préliminaires.....	117
4.2.2. Essai de dosage des HAP résiduels.....	117
4.2.3. Addition de salicylate.....	118
4.2.3.1. Analyses préliminaires.....	119
4.2.3.2. Effet du salicylate sur l'utilisation du phénanthrène.....	119
4.2.3.3. Comparaison avec le naphthalène.....	120
4.2.4. Etude des facteurs affectant la biodégradation des HAP par les souches Thouin.....	124
4.2.4.1 Essai avec six HAP.....	124

4.2.4.2. Étude préliminaire de la croissance sur l'anthracène en présence d'un surfactant synthétique.....	125
4.2.4.3. Étude de la biodégradation du phénanthrène en milieu SW avec mannitol.....	125
4.2.5. Essais de biodégradation du fluoranthène et du pyrène par les souches Thouin.....	130
4.2.5.1. Dégradation du fluoranthène en présence de mannitol ou de surfactant synthétique.....	130
4.2.5.2. Dégradation du fluoranthène et du pyrène en présence d'un surfactant synthétique.....	131
4.2.6. Étude de l'activité catabolique des souches <i>Sphingomonas</i> sp. 105 et 107.....	131
4.2.6.1. Dégradation du fluorène et du phénanthrène.....	131
4.2.6.2. Dégradation du fluoranthène et du pyrène.....	132
4.2.6.3. Effets du salicylate et du Tween 80 sur la dégradation du pyrène par la souche 107.....	132
4.2.6.4. Dégradation du fluoranthène, du pyrène, du benz[a]anthracène ou du chrysène par la souche 107.....	133
5. Bioproduction de surfactants ou d'émulsifiants.....	135
5.1. Mise au point des techniques.....	135
5.2. Essai avec la souche de référence UG2.....	138
5.3. Étude préliminaire des souches dégradant des HAP.....	138
5.3.1. Essai en culture liquide avec dextrose.....	138
5.3.2. Essai avec géloses SW.....	142
5.3.3. Essai en milieu BH avec mannitol.....	142
5.3.4. Milieu alternatif pour la production de biosurfactants.....	143
5.3.5. Cinétique de diminution de la tension superficielle.....	143
5.3.6. Etude de quelques isolats BDP avec le dextrose.....	147
5.4. Étude et optimisation de la production des biosurfactants.....	147
5.4.1. Importance du fer et de l'azote.....	150
5.4.2. Croissance et production de biosurfactants en présence d'un HAP.....	150
5.4.3. Effet de la production de biosurfactants sur la dégradation de l'anthracène.....	151
5.4.4. Cinétique de la production de biosurfactants à partir du mannitol.....	164
5.5. Étude de la capacité à produire des biosurfactants à partir d'un HAP comme substrat.....	171
5.5.1. Essai en SW avec naphthalène.....	171
5.5.2. Production de biosurfactants avec le naphthalène.....	171
5.5.3. Production de biosurfactants avec le phénanthrène.....	172
5.5.4. Recherche d'activités tensioactives ou émulsifiantes par les isolats BDP.....	172
5.6. Production de biosurfactants vs zones d'éclaircissement sur géloses pulvérisées avec un HAP.....	178
5.6.1. Géloses BH avec 2% dextrose.....	178
5.6.2. Pulvérisation de phénanthrène sur les géloses bleues SW.....	178
6. Étude de la production de biosurfactants avec le naphthalène comme substrat.....	179
6.1. Mise au point des techniques d'analyse.....	179
6.2. Influence de la concentration en fer.....	184
6.3. Effet de la composition de l'inoculum: cellules lavées vs culture complète.....	189
DISCUSSION.....	193
1. Micro-organismes.....	194

2. Criblage pour la biodégradation des HAP.....	195
2.1. Pulvérisation des HAP.....	195
2.2. Détection de l'activité de la naphtalène dioxygénase.....	197
3. Identification des souches.....	197
4. Utilisation des HAP.....	198
4.1. Stimulation par le salicylate de sodium.....	198
4.2. Étude et optimisation des conditions de dégradation.....	200
4.3. Biodégradation des HAP de haut poids moléculaire.....	201
5. Production de biosurfactants.....	203
5.1. Criblage.....	203
5.2. Étude.....	205
5.3. Production à partir du naphtalène.....	206
6. Perspectives.....	209
6.1. Rôle physiologique des biosurfactants.....	209
6.2. Lien entre les biosurfactants et la biodégradation des hydrocarbures.....	209
 CONCLUSION.....	 212
REMERCIEMENTS.....	214
BIBLIOGRAPHIE.....	215
ANNEXE.....	232

## LISTE DES TABLEAUX

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU 1: Hydrosolubilité de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques	11
TABLEAU 2: Paramètres affectant la sorption des contaminants organiques aux sols et sédiments.	31
TABLEAU 3: Quelques biosurfactants et les micro-organismes qui les produisent	48
TABLEAU 4: Variations des propriétés des rhamnolipides de <i>Pseudomonas</i> sp. DSM 2874 à 40°C	55

### RÉSULTATS

TABLEAU 5: Contaminant présent dans la Sablière Thouin	96
TABLEAU 6: Bactéries isolées des réacteurs contenant des échantillons de sol contaminé de la Sablière Thouin.	97
TABLEAU 7: Analyse des souches Thouin avec la méthode par pulvérisation	103
TABLEAU 8: Résultats du criblage de plusieurs isolats BDP par pulvérisation sur géloses BHY	104
TABLEAU 9: Analyse qualitative de l'activité catabolique des isolats BDP, ainsi que de la majorité des souches les constituant.	106
TABLEAU 10: Sensibilité du test de la conversion de l'indole en indigo.	107
TABLEAU 11: Caractéristiques des <i>Pseudomonas</i> fluorescents, d'après Bergey's	110
TABLEAU 12: Identification des souches Thouin HAP+.	111
TABLEAU 13: Effet de la présence de salicylate de sodium dans la gélose	115
TABLEAU 14: Formation de zones d'éclaircissements sur géloses contenant différents suppléments.	116
TABLEAU 15: Évaluation de la croissance sur le phénanthrène avec ou sans salicylate de sodium.	121
TABLEAU 16: Comparaison de la croissance et de la dégradation du phénanthrène par trois souches Thouin. Cultures en BH avec différents suppléments.	127
TABLEAU 17: Dégradation du pyrène par la souche 107 avec et sans salicylate de sodium et Tween 80.	134
TABLEAU 18: Production de biosurfactants par des souches et isolats Thouin cultivées en BH avec 2% dextrose.	141

<b>TABLEAU 19: Détection de glycolipides anioniques autour de colonies sur géloses bleues SW.</b>	<b>144</b>
<b>TABLEAU 20: Production de biosurfactants et bioémulsifiants par des souches BDP cultivées en BH avec le dextrose (2%).</b>	<b>148</b>
<b>TABLEAU 21: Production de biosurfactants par les souches Thouin HAP+ en milieu minéral SW avec dextrose (2%).</b>	<b>149</b>
<b>TABLEAU 22: Effet du fer sur la production de biosurfactants, évaluée par la mesure du DCT.</b>	<b>153</b>
<b>TABLEAU 23: Culture de la souche 19SJ en BH ou SW avec différents enrichissements en présence ou absence de 100 ppm anthracène.</b>	<b>159</b>
<b>TABLEAU 24: Analyses ponctuelles de la production de biosurfactants et mesure du pH effectuées sur des échantillons de cultures de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ en BH et SW avec 50 ppm salicylate, 200 ppm anthracène et différents suppléments.</b>	<b>161</b>
<b>TABLEAU 25: Croissance et production de biosurfactants à partir du naphthalène.</b>	<b>174</b>
<b>TABLEAU 26: Activité émulsifiante de quelques souches et isolats BDP cultivés en BH et BHYS avec des 100 ppm chacun de fluorène, phénanthrène et fluoranthène.</b>	<b>177</b>

## LISTE DES FIGURES

### REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 1: Structures de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques.	9
FIGURE 2: Relation entre le poids moléculaire, la solubilité et la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques.	12
FIGURE 3: Voie catabolique de la dégradation du naphthalène	16
FIGURE 4: Dégradation du naphthalène, phénanthrène et anthracène par la voie catabolique de l'opéron supérieur.	18
FIGURE 5: Croissance d'une souche de <i>Pseudomonas</i> sp. sur le naphthalène.	29
FIGURE 6: Structures et propriétés de quelques surfactants synthétiques.	34
FIGURE 7: Arrangements supra-moléculaires possibles des surfactants.	36
FIGURE 8: Modèle proposé pour expliquer le mode d'action des surfactants.	41
FIGURE 9: Structure de quelques biosurfactants.	49
FIGURE 10: Différentes formes de rhamnolipides synthétisés par <i>Ps. aeruginosa</i> DSM 2659.	51
FIGURE 11: Voie biosynthétique de la production des rhamnolipides.	59
FIGURE 12: Régulation de la production de rhamnolipides chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

FIGURE 13: Transformation de l'indole en indigo par l'action de la NAP dioxygénase.	81
---	----

### RÉSULTATS

FIGURE 14: Cinétique de dégradation du fluorène et du phénanthrène par la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ en BH additionnée de 100 ppm salicylate (BHSal) et de 200 ppm naphthalène (BHNap).	122
FIGURE 15: Influence d'un milieu conçu pour la production de biosurfactants sur la dégradation du phénanthrène par la souche <i>Ps. aeruginosa</i> 19SJ.	128
FIGURE 16: Courbe étalon du rhamnose vs $A_{421}$ .	136
FIGURE 17: Culture de la souche de référence <i>Pseudomonas aeruginosa</i> UG2 en BH avec 2% dextrose.	139

FIGURE 18: Culture de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32R en BH avec 2% dextrose.	145
FIGURE 19: Croissance et production de rhamnolipides par la souche <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ cultivée en SW avec différentes concentration de fer.	154
FIGURE 20: Croissance et production de biosurfactants en BHS ou SWS avec 2% dextrose ou mannitol et en présence d'anthracène.	156
FIGURE 21: Culture de la souche 19SJ en BH ou SW avec différents enrichissements en présence ou absence de 100 ppm anthracène.	158
FIGURE 22: Comparaison de la croissance de la souche 19SJ en SW avec mannitol à 23°C et 30°C avec ou sans ajout de 0,01 g/l FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O.	162
FIGURE 23: Production de biosurfactants par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32R cultivé en SW avec 2% mannitol.	166
FIGURE 24: Production de biosurfactants par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 32R et 32S cultivés en SWF avec 2% mannitol.	168
FIGURE 25: Production de biosurfactants par <i>Pseudomonas putida</i> 34 cultivé en SWF avec 1% naphthalène.	175
FIGURE 26 : Courbe étalon du salicylate de sodium vs A <sub>750</sub> .	180
FIGURE 27: Accroissement de la solubilité apparente du phénanthrène en fonction de la concentration de rhamnolipides.	182
FIGURE 28: Production de biosurfactants par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ cultivé en SW, SWF et SWFe avec 2% naphthalène.	185
FIGURE 29: Production de biosurfactants par la souche 19SJ cultivée en SWF avec 2% naphthalène.	190

## ANNEXE

FIGURE 30: Fragmentogramme d'un métabolite présumé de la biodégradation du naphthalène isolé d'une zone d'éclaircissement autour d'une colonie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19SJ.	233
FIGURE 31: Analyse de la phase étherée obtenue de l'extraction de zones d'éclaircissement autour de colonies de <i>Pseudomonas</i> sp. 6 sur géloses TSA recouvertes de naphthalène pulvérisé.	235
FIGURE 32: Voie catabolique du naphthalène proposée par Denome <u>et al.</u> (1993).	238
FIGURE 33: Fragmentogramme d'un métabolite de la dégradation du fluorène par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 19R.	241

- FIGURE 34: Analyse par chromatographie en phase gazeuse d'un échantillon d'éther concentré obtenu de l'extraction d'une culture de la souche 107 en BHY avec 200 ppm de Tween 80 et 200 ppm de fluoranthène. 243
- FIGURE 35: Analyse par chromatographie en phase gazeuse d'un échantillon d'éther concentré obtenu de l'extraction d'une culture de la souche 107 en BHY avec 200 ppm de benz[a]anthracène. 245
- FIGURE 36: Voie métabolique du benz[a]anthracène de *Beijerinckia* (*Sphingomonas yanoikuyae* B1, proposée par Mahaffey et al. (1988). 247

## ABRÉVIATIONS

BH: milieu de sels minéraux Bushnell-Haas.

BHY: milieu de sels minéraux Bushnell-Haas supplémenté de 0,05% extrait de levure.

BHYS: milieu de sels minéraux Bushnell-Haas supplémenté de 0,05% extrait de levure et 100 ppm salicylate de sodium

BSTFA: bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide. Agent de dérivation pour analyses en chromatographie en phase gazeuse.

CMC: concentration micellaire critique.

DCT: "Drop Collapsing Test", utilisé pour estimer la présence de biosurfactants.

EHL: Équilibre hydrophile-lipophile.

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques.

mN/m: (mesure de la tension superficielle en) milliNewton/mètre.

PPYE: supplément constitué de 0,1% Protéose-peptone et extrait de levure.

*Ps.*: *Pseudomonas*

SW: milieu de sels minéraux Siegmund-Wagner .

SWF: milieu de sels minéraux Siegmund-Wagner supplémenté de 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

SWFe: milieu de sels minéraux Siegmund-Wagner supplémenté de 0,1 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

TS: Tension de surface ou superficielle.

## SOMMAIRE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants organiques largement distribués dans l'environnement. Ils représentent un risque élevé pour la santé et il est donc nécessaire de restaurer les nombreux sites contaminés. Les technologies de traitements biologiques utilisant le potentiel des micro-organismes à dégrader une grande variété de substances organiques présentent plusieurs avantages sur les technologies physico-chimiques traditionnelles. Cependant, la restauration d'un site contaminé par des HAP est limitée par la faible biodisponibilité de ces polluants hydrophobes et non-polaires. L'addition de surfactants permettrait d'augmenter la solubilisation, la mobilisation et possiblement la biodégradation des polluants. Cependant, les surfactants synthétiques possèdent plusieurs désavantages qui rendent leur utilisation problématique. Les surfactants produits par des micro-organismes pourraient alors constituer une alternative nouvelle et intéressante.

Le but de ce projet consistait à isoler des micro-organismes dégradant des HAP et à déterminer s'ils pouvaient produire des biosurfactants en utilisant des HAP comme substrat. Pour ce faire, des bactéries isolés de sols contaminés par des hydrocarbures ont premièrement été criblés pour leur capacité à former des zones d'éclaircissement sur des géloses recouvertes d'un mince film de HAP pulvérisés. Des 84 souches bactériennes obtenues de la Sablière Thouin, un site ayant reçu des quantités importantes de résidus pétroliers au cours des années '60, 34 dégradaient ou transformaient au moins un HAP. L'étude du profil catabolique de ces souches nous a permis de déterminer que 23 d'entre elles, identifiées comme des *Pseudomonas* fluorescents, pouvaient croître avec un HAP de deux ou trois cycles aromatiques comme seul substrat. Elles pouvaient également transformer l'indole en indigo, une indication de la présence d'une activité de la naphthalène dioxygénase. L'addition de salicylate n'induisait la biodégradation des HAP que chez les souches de *Ps. aeruginosa*. Aucune des bactéries isolées de la Sablière Thouin n'ont pu dégrader les HAP comportant plus de trois anneaux aromatiques. Afin d'isoler des micro-organismes pouvant dégrader des HAP de plus haut poids moléculaire, des bactéries

provenant d'un sol prélevé à la base de poteaux de bois traités à la créosote ont été criblés selon la méthode par pulvérisation. Des isolats bactériens obtenus, deux souches identifiées comme des *Sphingomonas* sp. ont démontré la capacité de dégrader le fluoranthène, le pyrène et le benz[a]anthracène, des HAP de quatre cycles aromatiques. Ces deux *Sphingomonas* cultivées avec le dextrose ou une mixture de HAP produisaient un bioémulsifiant, mais pas de biosurfactant.

Parmi les 23 souches de Thouin capables de croître sur les HAP, les neuf *Ps. aeruginosa* et un *Ps. putida* pouvaient produire des biosurfactants en utilisant des substrats solubles comme le dextrose et le mannitol, ou un HAP comme le naphthalène. Nos observations suggèrent qu'il s'agit de rhamnolipides, le biosurfactant anionique habituellement sécrété par *Ps. aeruginosa*. Un milieu de culture pauvre en fer favorisait la production de biosurfactants. Nous avons observé qu'une activité émulsifiante, possiblement indépendante des rhamnolipides, se manifestait lors des cultures effectuées pour la production de biosurfactants. L'étude détaillée de la croissance et de la production de biosurfactants à partir du naphthalène a également permis de constater que l'hydrophobicité de la paroi cellulaire variait dans le temps.

Des micro-organismes croissant sur les hydrocarbures aliphatiques sécrètent des biosurfactants et des bioémulsifiants, ce qui facilite l'utilisation des substrats hydrophobes. Cependant, l'isolement de bactéries produisant des biosurfactants lors de la croissance sur des HAP représente un aspect nouveau par rapport aux travaux déjà publiés. Une meilleure compréhension des mécanismes microbiens responsables de la dégradation des HAP étant essentielle à l'amélioration des bio-traitements, les résultats obtenus contribuent à faire avancer les connaissances dans le domaine.

**«Le hasard ne favorise que les esprits préparés.»**

**-Louis Pasteur**

## INTRODUCTION

Le premier siècle de l'ère industrielle est à l'origine de l'accumulation dans l'environnement de quantités considérables de déchets anthropogènes. Ces contaminants sont devenus préoccupants lorsqu'on a constaté que certains pouvaient être toxiques. Parmi les polluants organiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent une source d'inquiétude particulièrement importante à cause de leur potentiel génotoxique et cancérigène. De plus, ce sont des polluants ubiquitaires qui peuvent persister dans l'environnement pour une longue période de temps.

La restauration des sols et sédiments contaminés par ces composés représente donc un défi tout autant scientifique que socio-économique. Plusieurs technologies de décontamination existent mais le traitement biologique possède de nombreux avantages tels un coût d'application moindre et le respect de l'environnement. L'efficacité de la biorestauration est néanmoins limitée par la faible biodisponibilité des HAP. En effet, ces contaminants hydrophobes et insolubles ont tendance à s'adsorber fortement à la matière organique des sols et sont par conséquent moins accessibles à l'attaque microbienne. Des recherches sont donc nécessaires afin de mieux comprendre les processus naturels à l'oeuvre lors de la biodégradation des HAP, et ainsi améliorer la performance des biotraitements.

L'emploi d'agents tensioactifs (surfactants) représente une solution prometteuse aux problèmes de biodisponibilité. Ils peuvent faciliter la désorption et la solubilisation des polluants hydrophobes afin d'augmenter leur accessibilité aux micro-organismes. Cependant, l'addition de surfactants synthétiques comporte de nombreux désavantages: ils sont souvent non-biodégradables et leur mode d'action est mal connu. En plus de leurs coûts élevés, ils peuvent contribuer à étendre la contamination et sont parfois toxiques pour la microflore indigène. Il y a donc nécessité d'explorer de nouvelles avenues. Par exemple, certains micro-organismes peuvent produire leurs propres biosurfactants, lesquels sont biodégradables et potentiellement spécifiques. Cette caractéristique serait liée à leur capacité d'utiliser des substrats peu solubles tels les hydrocarbures.

Le but principal de ce travail consistait à déterminer si des micro-organismes métabolisant des HAP posséderaient aussi la faculté de produire des biosurfactants (molécules amphiphiles formant des micelles et diminuant la tension superficielle d'un liquide) ou des bioémulsifiants (mixture non-définie de bio-polymères démontrant un pouvoir émulsifiant).

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## **1. INTRODUCTION**

Dans la prochaine section, il sera question des HAP et des mécanismes bactériens responsables de leur dégradation. L'efficacité des méthodes de biorestauration des sols contaminés par des hydrocarbures hydrophobes est confrontée à plusieurs problèmes, dont leur faible biodisponibilité aux micro-organismes. Ainsi, la récalcitrance des HAP s'expliquerait en grande partie par leur hydro-solubilité très limitée et leur tendance à s'adsorber fortement aux sols. L'utilisation de surfactants a été proposée comme moyen de favoriser la biodisponibilité et la biodégradation des HAP. Cependant, les micro-organismes impliqués dans les bio-traitements possèdent des mécanismes leur permettant d'accéder aux substrats hydrophobes. La production de surfactants pourrait représenter une des ces astuces métaboliques.

## **2. HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

### **2.1. Origines (sources)**

Les HAP proviennent de la combustion incomplète de combustibles d'origine fossile (pétrole, houille, goudron). La transformation de la houille, l'entreposage de déchets de raffineries, déversements de pétroliers, effluents d'industries pétrochimiques, gaz d'échappement de véhicules motorisés, aliments fumés, frits ou grillés, fumée de tabac, feux de forêts et de prairies, incinération de déchets, etc. illustrent la diversité des sources naturelles et anthropogènes (Cerniglia, 1992). Le traitement du bois à la créosote, lequel est constitué d'environ 85% de HAP (Mueller *et al.*, 1989b), représente une source particulièrement importante puisque la consommation annuelle s'établit à plusieurs centaines de milliers de tonnes métriques aux États-Unis seulement. Conséquemment, dans les pays, tel le Canada, où cette activité industrielle a lieu, se retrouvent des concentrations très élevées.

### **2.2. Structures**

Les HAP sont formés de deux cycles benzéniques et plus. Les hydrocarbures naphthénoaromatiques (polyaromatiques possédant un cycle à cinq carbonés) leur sont

habituellement associés (Figure 1). Parfois, les composés polyaromatiques portant des groupements nitro ou alkyl, ou bien substitués par des atomes de soufre, d'azote ou d'oxygène (hétérocycliques) sont souvent classés dans le même groupe.

### **2.3. Caractéristiques**

L'exposition quotidienne aux HAP que subissent les gens vivant dans des régions fortement industrialisées représente un risque important pour la santé (Dipple *et al.*, 1990). Les HAP se retrouvent sur la liste des polluants d'importance prioritaire de l'Environmental Protection Agency (EPA) des États-Unis (Keith et Telliard, 1979) puisque le potentiel cancérigène de plusieurs est reconnu: le benz[a]anthracène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le chrysène et le dibenzo[a,h]fluoranthène (Madsen, 1991).

Le caractère mutagène, génotoxique et cancérigène (White, 1986) des HAP s'explique par leur très grande stabilité, conférée par la résonance des cycles aromatiques. Les HAP sont des composés hydrophobes très peu solubles dans l'eau (Tableau 1). Leur lipophilicité, toxicité et persistance dans l'environnement augmentent parallèlement à leur poids moléculaire (Figure 2).

## **3. BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

Certains micro-organismes ont développé des mécanismes leur permettant d'utiliser des HAP comme source de carbone et d'énergie. Plusieurs revues bibliographiques très complètes ont récemment été publiées sur ce sujet (Cemiglia, 1984, 1992, 1993; Cemiglia et Heitkamp, 1989; Cutright et Lee, 1994; Shuttleworth et Cemiglia, 1995).

### **3.1. Micro-organismes**

Plusieurs genres microbiens possèdent l'habileté de dégrader et métaboliser des HAP, mais un micro-organisme seul peut rarement en dégrader une grande variété. Tenter de différencier les différents modes de dégradabilité rapportés dans la littérature est très difficile car les définitions de minéralisation, co-métabolisme, dégradation plus ou moins complètes ne sont

généralement pas équivalentes ni comparables d'un auteur à l'autre. Néanmoins, très peu de micro-organismes capables de dégrader complètement, ou même de seulement co-métaboliser, des HAP possédant plus de trois cycles aromatiques ont été observés en cultures pures (Cerniglia, 1993). Les HAP de haut poids moléculaire sont généralement considérés récalcitrants (Cerniglia et Heitkamp, 1989). Cependant, certains travaux récents suggèrent que des micro-organismes capables de dégrader des HAP de haut poids moléculaire se retrouvent plus couramment qu'anticipé (Kästner et al., 1994). Au cours des dernières années, la littérature rapporte plusieurs bactéries démontrant le potentiel de transformer, dégrader ou minéraliser certains HAP de plus de trois cycles (incluant le pyrène, le benz[a]anthracène, le chrysène et le benzo[a]pyrène): *Beijerinckia* sp. (*Sphingomonas yanoikuyae*) B1 [B8/36] (Gibson et al., 1975; Mahaffey et al., 1988; Khan et al., 1996), *Mycobacterium* sp. Pyr-1 (Heitkamp et al., 1988a; Kelley et Cerniglia, 1991), *Pseudomonas* (*Sphingomonas*) *paucimobilis* EPA 505 (Mueller et al., 1990; Ye et al., 1996), *Alcaligenes denitrificans* WW1 (Weissenfels et al., 1990); *Rhodococcus* sp. UW1 (Walter et al., 1991), *Mycobacterium* sp. BB 1 (Boldrin et al., 1993), *Ps. fluorescens* (Caldini et al., 1995), et *Mycobacterium* sp. RJGII-135 (Grosser et al., 1991; Schneider et al., 1996).

La biodégradation des HAP contenant un cycle à cinq carbones (naphténoaromatiques), comme le fluorène et l'acénaphthylène, a été peu étudiée (Grifoll et al., 1994). Il semble qu'ils seraient habituellement co-métabolisés (Stringfellow et Aitken, 1995; Walter et al., 1991; Boldrin et al., 1993; Weissenfels et al., 1991; Mueller et al., 1990; Schocken et Gibson, 1984), et plus rarement utilisables comme seul substrat (Weissenfels et al., 1990; Grifoll et al., 1992; Grifoll et al., 1994; Grifoll et al., 1995; Komatsu et al., 1993).

Bien que peu étudiés, on sait que des champignons du type moisissure peuvent aussi transformer des HAP par l'action de peroxydases et de monoxygénases (Sutherland, 1992). Il est possible que leur action soit très importante lors de la biorestauration de sols contaminés. Ils n'utilisent pas les HAP comme source de carbone et d'énergie mais plutôt les co-métabolisent en sous-produits potentiellement plus facilement biodégradables par les bactéries.

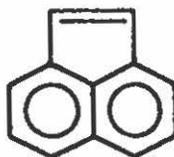
**FIGURE 1:** Structure et nom de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques  
(Wilson et Jones, 1993).



Naphthalene  
(C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>)



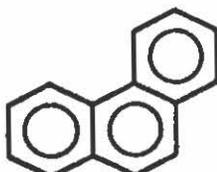
Acenaphthene  
(C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>)



Acenaphthylene  
(C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>)



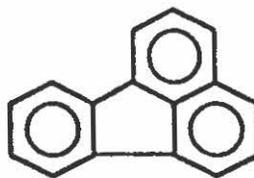
Fluorene  
(C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>)



Phenanthrene  
(C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>)



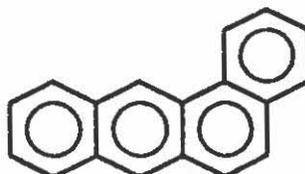
Anthracene (C<sub>14</sub>H<sub>10</sub>)



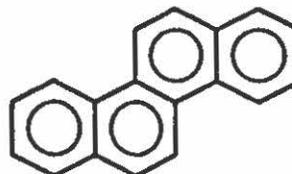
Fluoranthene (C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>)



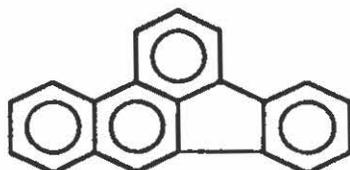
Pyrene  
(C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>)



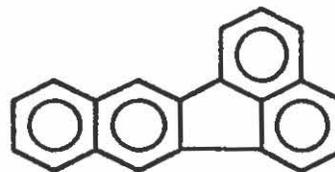
Benz[a]anthracene  
(C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>)



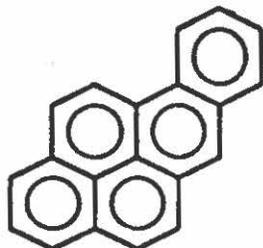
Chrysene (C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>)



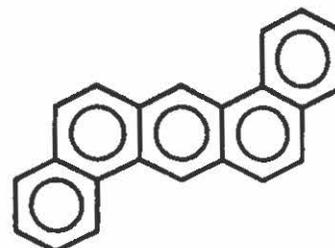
Benzo[b]fluoranthene (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>)



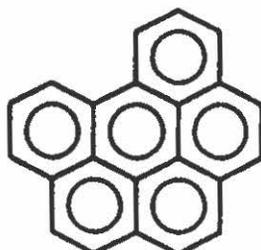
Benzo[k]fluoranthene (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>)



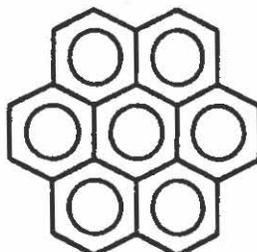
Benzo[a]pyrene (C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>)



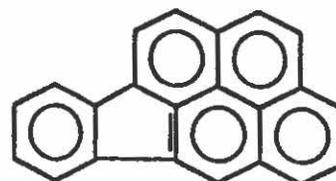
Dibenz[a,h]anthracene (C<sub>22</sub>H<sub>14</sub>)



Benzo[ghi]perylene (C<sub>22</sub>H<sub>12</sub>)



Coronene (C<sub>24</sub>H<sub>12</sub>)

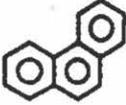
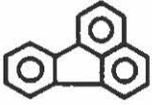
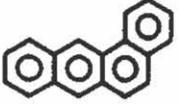


Indeno[1,2,3-cd]pyrene  
(C<sub>23</sub>H<sub>12</sub>) \*

**TABLEAU 1:** Hydro-solubilité de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques (Mackay et Shiu, 1977; Baker et al., 1984)

Composé	Solubilité (mg/l)	Composé	Solubilité (mg/l)
Naphtalène	31,7	Anthracène	0,073
Biphényle	7,0	Fluoranthène	0,26
Acénaphthène	3,47	Pyrène	0,135
Acénaphthylène	3,93	Benz[a]anthracène	0,014
Fluorène	1,98	Chrysène	0,0020
Phénanthrène	1,29	Benzo[a]pyrène	0,0038

**FIGURE 2.** Relation entre le poids moléculaire, la solubilité et la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Cerniglia, 1993). La récalcitrance à la biodégradation augmente en fonction de l'accroissement de la masse et de la diminution de l'hydro-solubilité

	HAP	Solubilité (mg/l)	Toxicité
 Recalcitrance	 Naphthalene	31.7	non-cancérogène
	 Acenaphthene	3.9	non-cancérogène
	 Anthracene	0.07	non-cancérogène
	 Phenanthrene	1.3	non-cancérogène
	 Fluoranthene	0.26	faible cancérogène
	 Pyrene	0.14	non-cancérogène
	 Benz[a]anthracene	0.002	cancérogène
	 Benzo[a]pyrene	0.003	cancérogène

### **3.2. Mécanismes enzymatiques et voies métaboliques.**

La voie métabolique de dégradation microbienne du naphthalène, le plus simple des HAP, est bien connue (Cerniglia et Heitkamp, 1989). Le modèle le mieux étudié est le métabolisme du naphthalène par *Ps. putida* PpG7 (Yen et Serdar, 1988). Cette souche possède le plasmide NAH7 qui contient les gènes *nah* responsables de la biodégradation oxydative du naphthalène. La première étape consiste en la formation de *cis*-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalène par l'action d'un système enzymatique appelé naphthalène dioxygénase. Ce *cis*-dihydrodiol est ensuite dégradé jusqu'au salicylate (Eaton et Chapman, 1992). La minéralisation se poursuit par l'action d'une deuxième série d'enzymes pour finalement produire des intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique (Figure 3).

L'oxydation par une monoxygénase pour former des *trans*-dihydrodiols a aussi été observée lors de la dégradation du pyrène par *Mycobacterium* sp. (Heitkamp et al., 1988b).

Il semblerait finalement que le système enzymatique de dégradation du naphthalène soit aussi impliqué dans les premières étapes de la dégradation des HAP de plus haut poids moléculaire. Des résultats récents ont démontré que les systèmes *nah* (Sanseverino et al., 1993), *dox* (Denome et al., 1993), *pah* (Kiyohara et al., 1994) et *ndo* (Yang et al., 1994) sont impliqués dans la dégradation de HAP comme le phénanthrène ou l'anthracène en leurs acides naphthoïques respectifs (Figure 4).

La grande majorité des recherches sur la biodégradation des HAP a démontré que l'oxygène sert non seulement d'accepteur d'électrons mais est aussi incorporé lors de l'oxydation des cycles aromatiques. Or, les contaminants se retrouvent souvent dans un environnement où la concentration en oxygène est limitée. Certains travaux suggèrent que les HAP puissent aussi être dégradés en conditions dénitrifiantes (Mihelcic et Luthy, 1988).

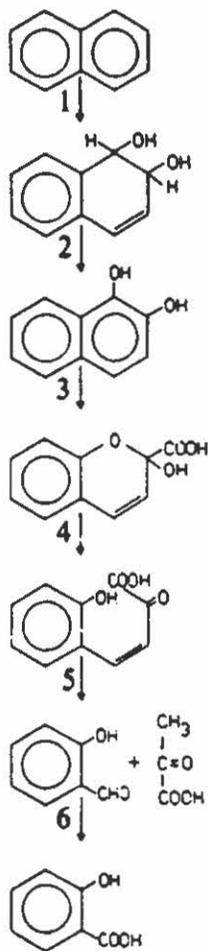
### 3.3. Génétique et régulation

Énormément de connaissances ont été acquises sur les gènes impliqués dans la dégradation du naphthalène par *Pseudomonas* (Yen et Serdar, 1988). *Ps. putida* PpG7 utilise une voie catabolique portée par le plasmide NAH7. Ce dernier contient l'opéron *nah* qui possède les gènes (*nahA-F*) codant pour les enzymes responsables de la dégradation du naphthalène en salicylate, et l'opéron *sal* (*nahG-M*) sur lequel se trouvent les gènes pour les enzymes servant à la transformation du salicylate en catéchol puis finalement en pyruvate. La régulation des deux opérons est contrôlée par le gène *nahR*, dont l'inducteur est le salicylate (Barnsley, 1975). D'autres gènes codant pour la dégradation du naphthalène au salicylate ont été décrits: *Ps. putida* NCIB 9816 possède les gènes *ndo* (Ensley et al., 1983), *Pseudomonas* sp. C18 les gènes *dox* (Denome et al., 1993) et *Ps. putida* OUS82 les gènes *pah* (Kiyohara et al., 1994). Les séquences de ces différents opérons sont très similaires (Takizawa et al., 1994; Denome et al., 1993).

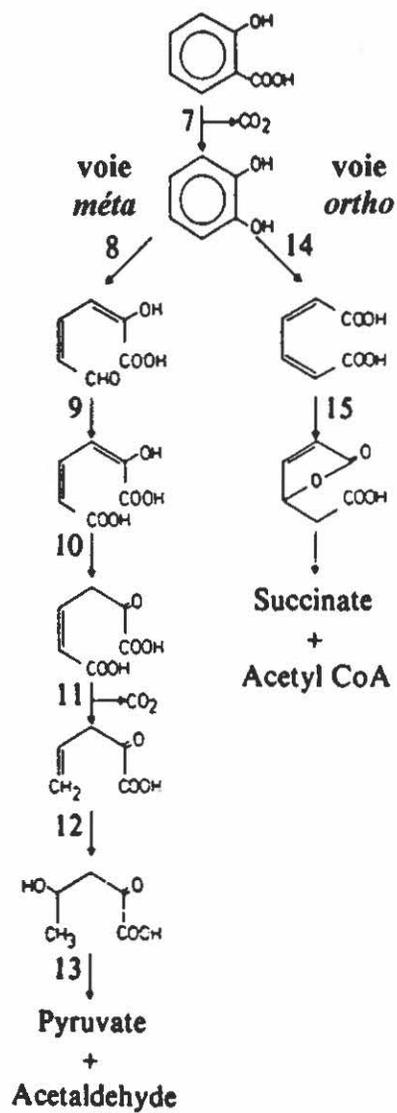
Beaucoup de recherches ont été effectuées sur la biodégradation des hydrocarbures polyaromatiques en conditions expérimentales, généralement avec un seul hydrocarbure et une souche microbienne pure. Cependant, ils se retrouvent habituellement dans les sites contaminés sous forme de mélanges complexes de polluants, souvent partiellement dissouts dans une phase liquide hydrophobe. La destinée des HAP dans de tels environnements a été très peu étudiée. La compréhension des mécanismes de transport et du métabolisme nécessite donc plus de recherches. Des travaux supplémentaires sont également requis pour comprendre pourquoi les HAP de haut poids moléculaire sont si récalcitrants.

**FIGURE 3:** Voie catabolique de la dégradation du naphthalène (Cane et Williams, 1986).

### Oxydation du naphthalène



### Oxydation du salicylate

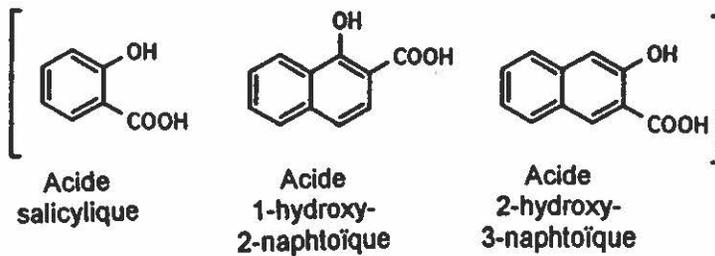
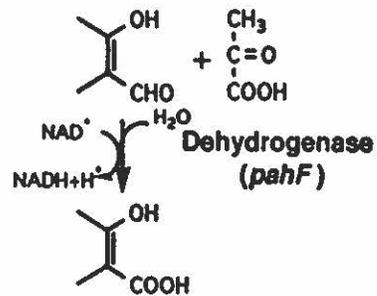
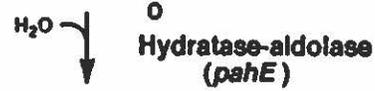
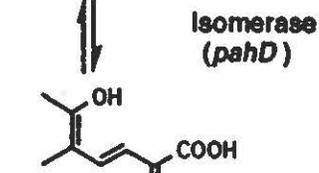
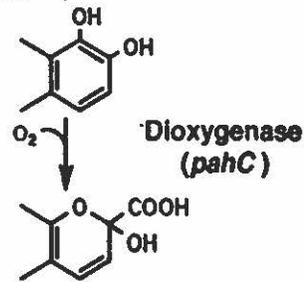
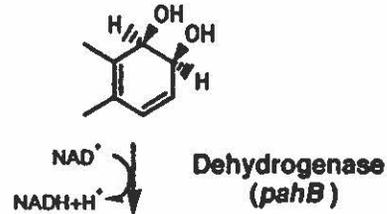
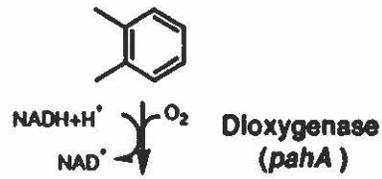
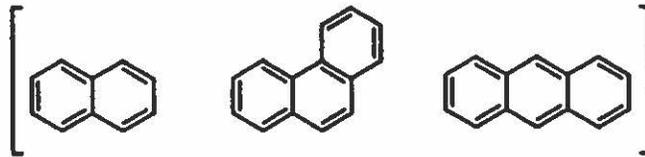


**FIGURE 4:** Dégradation du naphthalène, phénanthrène et anthracène par la voie catabolique de l'opéron supérieur (Kiyohara et al., 1994). Des travaux récents ont démontrés que la voie catabolique responsable de la dégradation du naphthalène peut également transformer des HAP de trois cycles aromatiques.

Naphtalène

Phénanthène

Anthracène



#### **4. RESTAURATION DE SITES CONTAMINÉS**

Plusieurs sorts possibles attendent les HAP dans l'environnement: volatilisation, adsorption et adhérence à la matière organique du sol, oxydation chimique, photo-décomposition (photo-oxydation), bioaccumulation, et biodégradation (Cerniglia et Heitkamp, 1989; Park et al., 1990a et b). La dégradation microbienne est le processus de détoxification naturel le plus important (Sims et Overcash, 1983; Bossert et al., 1984). Les HAP ne sont généralement pas considérés comme des substances xénobiotiques (ex. composés aromatiques chlorés comme les BPC), c.-à-d. des composés chimiques d'origine humaine auxquels les micro-organismes n'ont pas été suffisamment exposés au cours de l'évolution pour favoriser le développement de mécanismes cataboliques (Janke et Fritsche, 1985; Rosenberg, 1993) [pour plus de détails, voir Morgan et Watkinson, 1989].

Les contaminants organiques se retrouvent habituellement dans des mixtures complexes de polluants. La co-oxydation permet souvent la transformation partielle des HAP de haut poids moléculaire, lesquels sont moins biorésistants en mélange qu'à l'état pur (Sims et Overcash, 1983). Néanmoins, la minéralisation complète du polluant est plus souhaitable que l'accumulation de sous-produits potentiellement plus toxiques (Wilson et Jones, 1993).

On retrouve deux catégories de méthodes de dépollution (Morgan et Watkinson, 1989), les technologies physico-chimiques et les technologies biologiques.

##### **4.1. Technologies physico-chimiques**

Ces méthodes sont relativement bien établies, surtout l'incinération à haute température. Cette dernière constitue actuellement la meilleure solution pour décontaminer des sols ou sédiments contenant de fortes concentrations de polluants, comme des boues industrielles. Elle implique toutefois la destruction du sol (disparition de la matière organique) et des coûts importants. La combustion nécessite beaucoup d'énergie, et il y a possibilité d'émanations de CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> et SO<sub>x</sub>.

## **4.2. Technologies biologiques**

La biorestauration implique l'utilisation de micro-organismes pour dégrader des substances organiques polluantes en sous-produits inoffensifs, comme de l'eau, du dioxyde de carbone et une biomasse (Singleton, 1994). Pour beaucoup de polluants, c'est une approche préférable à l'incinération car elle pourrait potentiellement être beaucoup plus économique et versatile, et tout aussi efficace (Wilson et Jones, 1993; Alexander, 1991). Enfin, elle est également mieux acceptée par la population (Larose, 1993).

### **4.2.1. Méthodes de bio-traitement**

Cette approche comprend différents systèmes qui peuvent être séparés en trois catégories. Une revue exhaustive a été publiée récemment (Wilson et Jones, 1993).

#### **4.2.1.1. In situ**

Le sol contaminé n'est pas déplacé. Les amendements et les nutriments sont fournis directement au site à traiter via la phase aqueuse. De l'oxygène peut être ajouté sous la forme de peroxyde d'hydrogène. On peut aussi ensemercer avec des micro-organismes spécialement adaptés ou sélectionnés (bio-augmentation). Le facteur déterminant pour que cette méthode puisse fonctionner est la biodisponibilité de l'oxygène.

#### **4.2.1.2. Ex situ**

Des méthodes comme le «landfarming» ou la formation de bio-piles permettent un meilleur contrôle des paramètres importants comparativement au traitement *in situ*. Le traitement complet consiste en l'excavation de la terre contaminée et à la mise en piles que l'on recouvre d'une membrane géotextile. Ces piles peuvent être aérées, mélangées, ensemençées avec des micro-

organismes adaptés, enrichies de nutriments etc. Ce qui se traduit par une meilleure efficacité, surtout pour la dégradation des HAP de faible et moyen poids moléculaire. Toutefois, l'excavation pourrait provoquer la volatilisation des polluants les plus légers.

#### **4.2.1.3. En bioréacteurs**

D'une efficacité et rapidité supérieure aux technologies précédentes, elle permet plus aisément de maintenir les conditions optimales à la biodégradation par l'ajout de nutriments ou de surfactants, l'agitation, l'aération et l'inoculation sélective de cultures microbiennes dégradant les HAP. Évidemment plus coûteux, on choisira le bio-traitement en réacteurs pour de faibles quantités de sol à décontaminer ou lorsque qu'il s'agit de polluants plus récalcitrants.

#### **4.2.2. Paramètres importants**

Les principaux facteurs limitant la biodégradation de composés récalcitrants ont fait l'objet d'une revue récente (Providenti *et al.*, 1993). Trois catégories de paramètres doivent être optimisés afin de favoriser le bio-traitement de sites contaminés (Blackburn et Hafker, 1993):

##### **4.2.2.1. Présence de micro-organismes adaptés**

Des micro-organismes déjà adaptés se rencontrent partout dans l'environnement puisque les HAP sont des substances naturelles. Habituellement, plus un site renferme une haute concentration de HAP et plus la proportion de micro-organismes adaptés augmente (Cerniglia, 1993).

##### **4.2.2.2. Conditions environnementales**

Les paramètres environnementaux doivent favoriser la croissance des micro-organismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures (Leahy et Colwell, 1990). Puisque

l'importance de ces facteurs varie d'un site à un autre, chaque site à décontaminer doit être évalué individuellement. Voici une brève liste des facteurs importants (Wilson et Jones, 1993; Morgan et Watkinson, 1989):

- Humidité (teneur en eau): un sol trop sec ne permet pas la croissance microbienne, alors qu'un sol saturé réduit la disponibilité de l'oxygène;
- La température: peut affecter l'état physico-chimique des contaminants et leur association avec les composantes du sol, ainsi que l'activité et la composition de la communauté microbienne;
- Emplacement et nature géologique du sol (granulométrie: sable, argile, silt...);
- Nutriments inorganiques (disponibilité des sels minéraux): l'azote et le phosphore manquent souvent aux micro-organismes;
- Oxygène: nécessaire car les HAP sont généralement dégradés en aérobiose (Bauer et Capone, 1985). L'oxygène devient souvent le facteur limitant en profondeur dans les sols. La disponibilité est influencée par le type de sol et la présence d'eau;
- pH: souvent très variable, la valeur idéale se situe près de la neutralité;
- Présence d'autres substrats plus facilement assimilables: les micro-organismes pourraient les utiliser préférentiellement et risquer d'épuiser l'oxygène disponible;
- Présence de substances toxiques tel certains métaux peut gêner l'activité des micro-organismes;

#### 4.2.2.3. Biodisponibilité du substrat

Finalement, les contaminants doivent être accessibles aux micro-organismes afin de servir de substrat. Les propriétés structurelles et chimiques du sol et celles des substances polluantes elles-mêmes vont affecter leur disponibilité. Entre autres, les contaminants se retrouvent habituellement dans l'environnement sous forme de mélanges hétérogènes. Les HAP pourraient

donc être dissous dans des hydrocarbures liquides hydrophobes comme des huiles, ce qui pourrait influencer leur accessibilité aux bactéries vivant dans la phase aqueuse.

L'importance de la biodégradation en tant que mécanisme de décomposition des HAP démontre le potentiel de la biorestauration pour dépolluer les sols contaminés. Toutefois, la biodégradation intrinsèque des HAP ayant plus de trois cycles aromatiques est relativement trop lente pour rendre attrayante l'application immédiate à grande échelle de cette biotechnologie. Une meilleure compréhension des processus naturels permettra d'améliorer cette méthodologie afin de la rendre plus largement applicable.

## **5. BIODISPONIBILITÉ**

La faible biodisponibilité des HAP se retrouvant dans les sols contaminés constituerait le principal facteur limitant la biorestauration. Mihelcic *et al.* (1993) ont récemment publié une revue bibliographique commentée exhaustive sur ce sujet.

En 1991, un groupe multidisciplinaire de spécialistes mis sur pied par l' EPA américaine a retenu quatre domaines de recherches prioritaires afin de résoudre les problèmes rencontrés lors de la biorestauration de certains sites contaminés par des composés récalcitrants. La première de ces recommandations se lit: « determining factors that govern the availability of pollutants for bioremediation and devising ways to increase their availability for microbial destruction. » (Alexander, 1991).

La biodisponibilité et la persistance des HAP dans l'environnement dépendent de leurs caractéristiques physiques et chimiques ainsi que de la composition et structure chimique du sol ou des sédiments.

Les bactéries n'utilisent les HAP que sous leur forme dissoute, et non par contact direct avec les particules solides (Wodzinski et Coyle, 1974). Ainsi, leur taux de biodégradation ne dépend pas *a priori* de facteurs biologiques mais plutôt de la vitesse de transfert de masse de la

phase solide vers la phase aqueuse (Volkering *et al.*, 1992; Aronstein et Alexander, 1992). Cela souligne également l'importance d'un taux d'humidité élevé dans les sols.

Deux groupes de facteurs peuvent influencer directement l'accessibilité des micro-organismes aux HAP, leur hydro-solubilité et vitesse de dissolution ainsi que leur sorption aux sols et sédiments.

### **5.1. Hydro-solubilité et vitesse de dissolution**

Depuis longtemps, la faible dégradabilité des HAP de haut poids moléculaire était surtout attribuée à leur récalcitrance. Des informations récentes suggèrent toutefois que leur très basse hydro-solubilité expliquerait plutôt leur catabolisme difficile et limité (Mihelcic *et al.*, 1993).

La solubilité dans l'eau des HAP est généralement inversement proportionnelle à leur poids moléculaire. Cependant, le taux de croissance spécifique d'un micro-organisme dégradant un HAP dépend directement de sa solubilité (Bossert et Bartha, 1986), et non de son nombre de cycles aromatiques. Ainsi, des micro-organismes dégradent le phénanthrène (ou même le pyrène) beaucoup plus rapidement que l'anthracène (e.g. Tiehm, 1994; Bossert et Bartha, 1986), lequel possède le même nombre de noyaux benzéniques mais est environ 20 fois moins soluble (Tableau 1).

La vitesse de solubilisation spontanée d'un hydrocarbure solide limite sa vitesse de dégradation (Stucki et Alexander, 1987). D'après les travaux de Wodzinski et Coyle (1974), la vitesse de dégradation des HAP est directement proportionnelle à leur solubilité dans l'eau plutôt qu'à leur concentration totale. Toutefois, des travaux récents proposent que la vitesse de dissolution d'un composé dépende de sa surface de contact totale avec le milieu liquide. Ainsi, Keuth et Rehm (1991) ont trouvé un accroissement du taux de minéralisation par une bactérie, quand ils augmentaient la concentration de phénanthrène dans le milieu de culture. Il est probable que la plus grande surface d'échange obtenue permettait un remplacement plus rapide de la portion soluble. Dans le même ordre d'idée, le transfert de masse peut être augmenté par

l'utilisation de fines particules de substrat, ce qui permet d'augmenter la surface d'échange et ainsi la vitesse de dissolution (Thomas et al., 1986; Volkering et al., 1992).

Volkering et ses collègues (1992) ont démontré que la solubilité et la vitesse de dissolution du naphthalène limitent la croissance d'une bactérie (Figure 5). Au début, la faible densité cellulaire de la culture initiale permet une croissance exponentielle puisque la concentration de naphthalène dissous suffit aux besoins métaboliques. Lorsque la densité cellulaire augmente jusqu'à ce que les exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution, la biodisponibilité devient alors limitante et la croissance linéaire. Cette dernière dépend alors de la vitesse de dissolution du naphthalène (pourtant il reste un excès de naphthalène solide à la surface du milieu de culture).

La vitesse de croissance bactérienne se limite donc à la vitesse de dégradation (Boldrin et al., 1993), laquelle dépend de la vitesse de solubilisation. La croissance sur les HAP est linéaire plutôt qu'exponentielle. L'utilisation d'une plus grande concentration de cellules ne permettrait donc pas une plus grande dégradation (Volkering et al., 1993). Pour connaître la véritable vitesse de croissance d'un micro-organisme sur un HAP, on doit pouvoir contourner les contraintes physico-chimiques liées au substrat en le rendant pleinement biodisponible.

Miller et Bartha (1989) ont suggéré que la récalcitrance d'un polluant puisse parfois s'expliquer par une limitation de son transport ("uptake") dans les micro-organismes. Les mécanismes d'assimilation des HAP par les micro-organismes ont été très peu étudiés (Providenti et al., 1993). Un phénomène de diffusion passive est généralement admis quoiqu'une récente communication suggère un système de transport actif (Whitman et al., 1995). Si un tel système existe, alors la vitesse de transport trans-membranaire deviendrait un facteur limitant très important à étudier (Mihelcic et al., 1993).

## **5.2. Sorption et vitesse de désorption**

L'immobilisation, par adsorption et absorption, des HAP aux sols et sédiments peut limiter leur biodisponibilité en ralentissant leur dissolution (Herbes et Schwall, 1978).

La concentration en carbone organique d'un sol (acides humiques et fulviques) représente le facteur le plus important affectant la sorption des HAP (Tableau 2; Means et al., 1980; Karickhoff et al., 1979). Plusieurs études ont démontré que l'affinité d'un contaminant pour la matière organique d'un sol dépend de l'hydrophobicité du composé (exprimée par le coefficient de partition octanol-eau ou  $K_{ow}$ ) (Dzombak et Luthy, 1984). Puisque les HAP possèdent des valeurs de  $K_{ow}$  très élevées, ils sont naturellement fortement sorbés aux sols riches en matière organique. Plus la concentration en carbone organique d'un sol est élevée, moins la proportion des HAP disponibles pour la dégradation est grande (Manilal et Alexander, 1991; Weissenfels et al., 1992).

Le modèle le plus simple pour représenter la biodégradation de substrats sorbés présuppose que seule la portion soluble est utilisée par les micro-organismes et que la sorption est réversible et plus rapide que la vitesse de dégradation. Toutefois des études récentes utilisent des modèles plus complexes admettant entre autres des variations dans la facilité et la vitesse de désorption (Mihelcic et al., 1993).

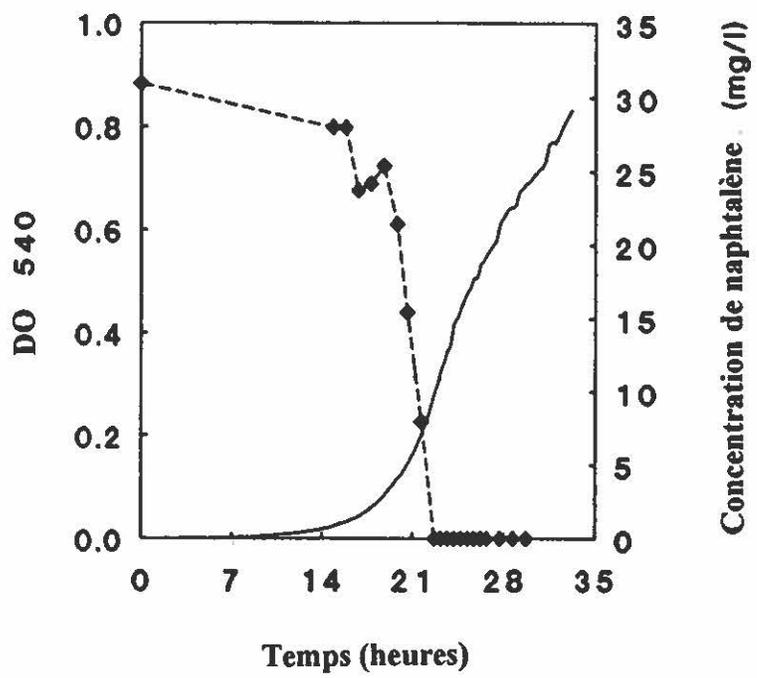
La cinétique de la sorption peut se séparer en deux processus dynamiquement distincts. Immédiatement après la réception du contaminant dans un sol, une première phase d'adsorption rapide et relativement réversible compétitionne avec la biodégradation. Elle est suivie par un processus d'absorption plus lent et plus stable, qui dure jusqu'à ce que l'équilibre de sorption soit atteint. Plus le contact entre les contaminants et le sol sera long, plus la sorption sera "tenace". Ainsi, des HAP nouvellement ajoutés à un sol seront plus facilement dégradés que des contaminants plus anciens (e.g. Erickson et al., 1993), lesquels seront non-disponibles mais également non-toxiques (Weissenfels et al., 1992).

Guerin et Boyd (1992) ont toutefois démontré que dans certaines conditions, du naphthalène dans un sol pouvait être disponible pour la dégradation par une espèce bactérienne donnée tout en étant non disponible à une autre. Ils suggèrent que la souche capable d'utiliser le HAP possédait des propriétés ou mécanismes particuliers lui permettant d'avoir accès à un substrat sorbé.

En résumé, il existe une corrélation entre le poids moléculaire, la faible hydro-solubilité, l'hydrophobicité, la sorption et la récalcitrance à la biodégradation. Comme mentionné

précédemment, la vitesse de transfert de masse de la phase solide à la phase liquide (solubilisation ou désorption) peut être augmentée par l'utilisation de plus fines particules de substrat. On peut également mélanger plus fortement (homogénéiser la dispersion des contaminants), ou ajouter un solvant organique (Efroymson et Alexander, 1991) ou un surfactant pour accroître la surface d'échange. Cependant ces méthodes sont difficilement applicables sur le terrain. Malgré l'optimisation des paramètres de dégradation, la biorestauration d'un sol contaminé par des HAP restera toujours incomplète et difficile tant que la biodisponibilité ne sera pas améliorée (Cemiglia, 1993).

**FIGURE 5.** Croissance d'une souche de *Pseudomonas* sp. sur le naphthalène (Volkering et al., 1992). —: croissance (DO à 540 nm). --◆--: concentration de naphthalène dissous. La croissance devient linéaire lorsque les exigences nutritionnelles des bactéries surpassent la vitesse de dissolution du naphthalène.



**TABLEAU 2.** Paramètres affectant la sorption des contaminants organiques aux sols et sédiments  
(adapté de Providenti *et al.*, 1993)<sup>a</sup>

Paramètres	Effets sur la sorption
<b>Type de sol</b>	
matière organique	augmente avec l'accroissement de la concentration en matière organique,
argile	augmente avec l'accroissement de la concentration en argile,
sable	diminue avec l'accroissement de la concentration en sable,
<b>Propriétés du sol</b>	
surface de contact et capacité échangeuse de cations (CEC)	plus grande la surface de contact et la CEC, plus grande l'adsorption,
<b>Paramètres environnementaux</b>	
température	diminue avec l'accroissement de la température
humidité du sol	diminue avec l'accroissement de l'hydratation
pH	varie avec le pH
Nature des contaminants	augmente avec l'accroissement de l'hydrophobicité

<sup>a</sup>Notons que ce sont des généralisations. Par exemple, la sorption des biphényles polychlorés (BPC) est indépendante de la température.

## **6. SURFACTANTS**

Les composés tensioactifs sont des molécules possédant une affinité particulière pour les interphases, i.e. la capacité de s'accumuler aux interfaces entre fluides de polarités différentes et d'en modifier les caractéristiques. Ils diminuent la tension de surface d'un liquide en altérant la formation de liens hydrogènes et les interactions hydrophiles-hydrophobes (l'eau possède la tension superficielle la plus élevée: 74 mN/m à 25°C). Ces substances peuvent réduire la tension superficielle de solutions aqueuses (air-eau), la tension interfacielle entre liquides immiscibles (e.g. eau-huile) et liquides-solides (mouillage) (Haferburg *et al.*, 1986).

L'industrie pétrolière consomme les plus grandes quantités de surfactant (400 millions de kg en 1982; Van Dyke *et al.*, 1991). La demande mondiale en 1983 totalisait 1,6 milliards kg et on prévoit des besoins approchant les 10 milliards de kg en l'an 2000 (Ochsner *et al.*, 1995c). On les retrouve dans les peintures, asphaltes, ciments, fibres et textiles, ainsi que comme anti-mousses et agents de préservation pour le bois. Ils sont également utilisés dans les industries alimentaires et cosmétiques, dans la préparation des fertilisants et pesticides pour l'agriculture, dans le traitement des eaux, etc.

### **6.1. Structures et catégories**

On classe généralement les surfactants synthétiques selon leur charge, soit non-ioniques, anioniques, ou cationiques.

### **6.2. Caractéristiques**

La structure de ces molécules amphiphiles (Figure 6) constituées d'un pôle hydrophile (polaire) et d'un pôle hydrophobe (oléophile), explique leurs propriétés particulières, comme la faculté de se répartir à l'interface de fluides immiscibles: eau-air ou eau-huile. La création d'un film moléculaire à l'interface influence les interactions entre les molécules de liquide en affectant la

formation de ponts hydrogènes et les interactions hydrophobes-hydrophiles (Georgiou *et al.*, 1992; Fiechter, 1992). Les molécules amphiphiles jouent un rôle important dans la nature. Par exemple, les phospholipides permettent aux membranes biologiques de garder leur intégrité et leur fluidité.

De nombreuses propriétés physico-chimiques caractérisent les surfactants synthétiques ou biologiques (Zajic et Seffens, 1984). Les trois suivantes seraient particulièrement importantes afin de comprendre les mécanismes mis en oeuvre lors de la facilitation de la biodégradation de substrats peu biodisponibles.

### **6.2.1. Concentration micellaire critique (CMC)**

Une des principales caractéristiques des surfactants est leur aptitude à former des agrégats moléculaires appelés micelles: un arrangement thermodynamiquement stable de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant un extérieur hydrophile et un intérieur hydrophobe (Figure 7b). Les micelles ont un diamètre d'environ 3 nm (Volkering *et al.*, 1995; Bury & Miller, 1993). La concentration de surfactant à laquelle les micelles commencent à s'agréger se nomme la concentration micellaire critique (CMC). Elle correspond à la solubilité maximale des molécules amphiphiles dans la phase aqueuse et donc à la quantité requise pour atteindre la tension superficielle la plus basse. Avant que la CMC soit atteinte, les molécules de surfactant existent sous une forme dissoute dans la phase liquide. Une fois la CMC dépassée, les molécules de surfactant supplémentaires formeront des micelles et la portion dissoute restera constante, tant que les conditions physico-chimiques ne varieront pas. Des changements de température, de pH ou l'ajout d'électrolytes peuvent modifier significativement la CMC (Rouse *et al.*, 1994; Ishigami *et al.*, 1987) et d'autres structures supra-moléculaires comme des liposomes pourront alors se former (Figure 7e).

**FIGURE 6:** Structures et propriétés de quelques surfactants synthétiques non-ioniques: les éthers d'alkyl éthoxylate (Neodol et Brij), les éthers d'alkylphénol éthoxylate (Triton et Tergitol) et les esters de polyoxyéthylène sorbitan (Tween). (Laha et Luthy, 1992).

Surfactant	Poids moléculaire moyen	CMC (mM)
------------	-------------------------	----------

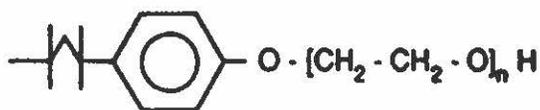
**Alkyl ethoxylate ethers**



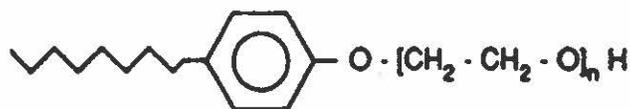
(i) C <sub>12-15</sub> E <sub>3</sub> (Neodol 25-3) n = 3	318	
(ii) C <sub>12</sub> E <sub>4</sub> (Brij 30) n = 4	363	0.02-0.04
(iii) C <sub>12-15</sub> E <sub>4</sub> (Neodol 25-9) n = 9	583	0.09
(iv) C <sub>12</sub> E <sub>23</sub> (Brij 35) n = 23	1200	0.06-0.08

**Alkylphenol ethoxylate ethers**

(i) C<sub>9</sub>PE<sub>9.5</sub> (Triton X-100)

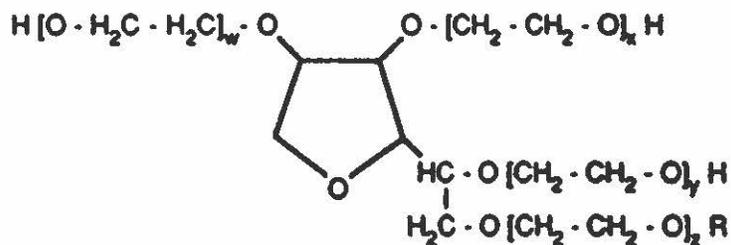


n = 9.5	625	0.24
(ii) C <sub>9</sub> PE <sub>10.5</sub> (Tergitol NP-10)		



n = 10.5	682	0.054-0.08
----------	-----	------------

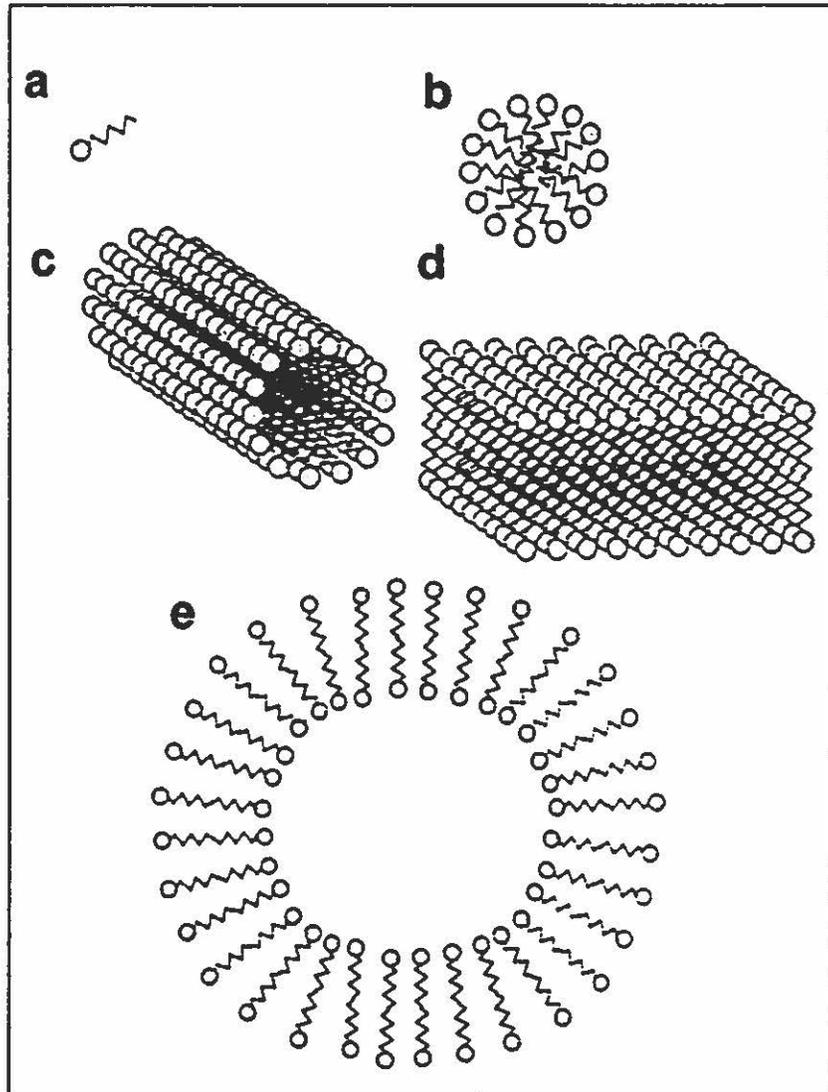
**Polyoxyethylene sorbitan esters**



(i) Tween 20 (monolaurate) w + x + y + z = 20, R = C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	~1200	0.49
(ii) Tween 80 (monooleate) w + x + y + z = 20, R = C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	~1300	0.01

**FIGURE 7:** Arrangements supra-moléculaires possibles des surfactants (Fiechter, 1992).

a, monomère constitué d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe. b, micelle sphérique usuel. c, micelle tubulaire. d, couche micellaire. e, vesicule ou liposome.



### 6.2.2. Tension superficielle

La tension de surface est une indication de la cohésion des molécules d'un liquide. La nature amphiphilique des surfactants explique leur tendance à s'accumuler à la surface de l'eau ou à l'interface avec un autre liquide, résultant en la diminution de la tension superficielle ou interfacielle. Les unités de la tension de surface équivalent à la force par la distance, mN/m, ce qui correspond à l'énergie par unité de surface, mJ/m<sup>2</sup>. La tension superficielle minimale d'une solution atteint rarement une valeur moindre que 30 mN/m (Zajic et Seffens, 1984), sous l'action de surfactants.

### 6.2.3. Équilibre hydrophile-lipophile (EHL)

La relation entre la portion hydrophile et la portion hydrophobe d'une molécule de surfactant constitue une autre caractéristique importante. Essentiellement, le ratio de la masse de la portion hydrophile sur la masse totale de la molécule indique la valeur de l'équilibre hydrophile-lipophile (EHL), laquelle augmente donc avec l'hydrophilicité de la molécule (Rouse *et al.*, 1994). Des surfactants avec des EHL inférieures formeront des micelles plus efficacement. La EHL peut donc servir d'indicateur de l'efficacité de la formation de micelles, de la solubilisation et émulsion des hydrocarbures, et aussi éventuellement d'indicateur de la compatibilité entre un surfactant et les membranes cellulaires.

$$\text{Équilibre hydrophile-lipophile} = \frac{\text{masse de la portion hydrophile de la molécule}}{\text{masse totale de la molécule}}$$

### 6.3. Augmentation de la biodisponibilité et dégradation des substrats inaccessibles

L'effet des surfactants sur la biodégradation dépend de plusieurs paramètres du système à l'étude, incluant les aspects physico-chimiques ainsi que les concentrations de surfactant et de substrat.

### 6.3.1. Mécanismes

Les surfactants (détergents, agents tensioactifs, solubilisants, dispersants) stimulent la biodégradation des substrats hydrophobes en améliorant leur biodisponibilité aux micro-organismes par l'augmentation de leur surface d'échange et de leur concentration dans la phase aqueuse. Néanmoins, même en présence de surfactant, la vitesse de dégradation d'un HAP dépend de sa solubilité (Tiehm, 1994).

On peut regrouper les mécanismes d'action des surfactants en trois catégories (Rouse et al., 1994):

- **Émulsion:** formation d'une suspension de fines gouttelettes d'un liquide immiscible dans un autre (West et Harwell, 1992; Zajic et Seffens, 1984). Parfois une diminution importante de la tension superficielle peut provoquer une émulsion spontanée (Rouse et al., 1994). Tous les surfactants peuvent agir comme émulsifiants, mais les émulsifiants ne sont pas tous des surfactants; surtout pour les hydrocarbures liquides.

- **Solubilisation:** accumulation de composés hydrophobes à l'intérieur de micelles. On parle aussi de pseudosolubilisation puisque les micelles dans une phase aqueuse forment une pseudophase (Edwards et al., 1991; Liu et al., 1991).

- **Désorption:** effet favorisant l'extraction des contaminants immobilisés sur les particules de sols et de sédiments (Vigon et Rubin, 1989); surtout pour les hydrocarbures solides.

Une multitude de résultats contradictoires sont rapportés dans la littérature au sujet du rôle et de l'efficacité des surfactants à augmenter la biodégradation des substrats peu solubles. Le lecteur peut consulter une revue exhaustive de la littérature (Rouse et al., 1994). La question majeure à considérer n'est pas de savoir si des surfactants peuvent effectivement accroître la

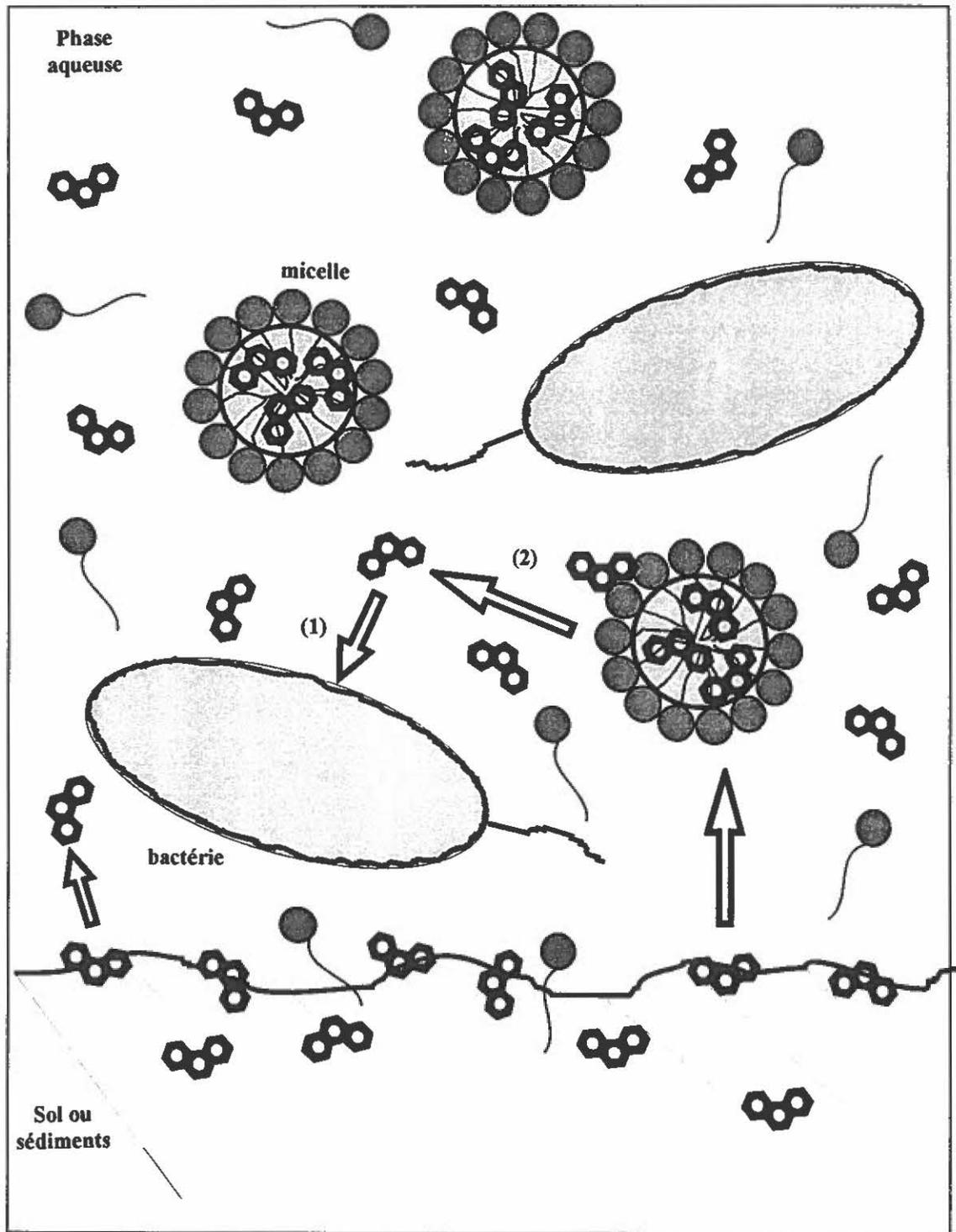
solubilité de substrats insolubles, mais de déterminer si les micro-organismes peuvent utiliser les substrats ainsi solubilisés, c'est-à-dire les hydrocarbures micellisés sont ils biodisponibles et les surfactants ont-ils un effet toxique ou inhibiteur sur les micro-organismes ? Au sujet des HAP, certains chercheurs ont trouvé une diminution ou une inhibition de la biodégradation (Laha et Luthy, 1991) tandis que d'autres observaient une stimulation (résumé dans Liu et al., 1995). Les travaux récents démontrent toutefois que des surfactant peuvent effectivement favoriser la biodégradation en augmentant la biodisponibilité.

Liu et Luthy ont observé que la présence de surfactants permettait la désorption des HAP retenus au sol grâce à la solubilisation (Edwards et al., 1994; Liu et al., 1991). Ils ont également démontré que du naphthalène solubilisé dans des micelles de Brij-30 ou Triton X-100 était disponible et dégradable par une culture bactérienne mixte ( Liu et al., 1995).

### **6.3.2. Modèle et hypothèses**

Le modèle le plus largement accepté illustrant le mode d'action des surfactants consiste en la formation d'une phase supplémentaire constituée de micelles qui servirait de réservoir de transition entre la phase insoluble (solide) et la phase soluble (aqueuse) (Figure 8). À mesure que les bactéries utilisent les HAP de la phase aqueuse, les molécules pseudo-solubilisées par les micelles diffusent vers la phase aqueuse pour maintenir la concentration maximale (Tiehm, 1994; Zhang et Miller, 1992). Ce modèle suppose donc que les bactéries n'utilisent les HAP que sous leur forme soluble (voir introduction de la section 5.). Pour que les surfactants améliorent la vitesse de dégradation, il faut également que la vitesse d'échange de la phase micellaire à la phase aqueuse soit supérieure à la vitesse de dissolution de la phase solide insoluble à la phase soluble aqueuse (vitesse de dissolution plus rapide car la surface de contact est plus grande) (Liu et al., 1995).

**FIGURE 8:** Modèle proposé pour expliquer le mode d'action des surfactants. Les molécules de HAP sorbées aux sols ou sédiments sont pseudosolubilisées dans les micelles. À mesure que les bactéries utilisent les HAP solubilisés dans la phase aqueuse (1), les HAP dans la pseudophase micellaire diffusent dans la phase aqueuse (2).



Une controverse a lieu actuellement à savoir si les substrats (HAP) pseudosolubilisés par des micelles servent effectivement de réservoir ou sont plutôt directement disponibles (Liu et al., 1995; Volkering et al., 1995). Ainsi, d'après Tiehm (1994), au moins deux mécanismes peuvent être responsables du transfert de HAP micellisés vers les micro-organismes: [1] maintien de la concentration soluble par diffusion (micelles comme phase-réservoir) ou [2] contact micelle-membrane et fusion, comme proposé par Miller et Bartha (1989).

Les surfactants pourraient avoir non seulement un effet sur l'augmentation de la solubilité, mais aussi sur la vitesse de dissolution des HAP (Grimberg et al., 1994). Ainsi, Volkering et al., (1995) soutiennent que le modèle basé sur une phase micellaire servant de réservoir sous-estime l'importance de la vitesse de dissolution des HAP sur leur biodisponibilité. Ils ont observé que des concentrations de surfactants supérieures à la CMC augmentaient les vitesses de dissolution maximale du naphthalène et du phénanthrène et ils proposent un phénomène de «transport facilité» comme explication. Ils ont également confirmé que les micro-organismes ne contactent pas directement les micelles et que ces derniers forment effectivement une phase séparée maintenant la concentration des HAP en solution.

### 6.3.3. Travaux expérimentaux et applications

Lors de l'étude de la dégradation de certains HAP par des bactéries, des chercheurs ont ajouté des surfactants afin d'accroître la solubilité du substrat, et ainsi surmonter le limite imposée par leur biodisponibilité. Mueller et al. (1989a, 1990) utilisaient le surfactant non-ionique Tween 80 pour augmenter la solubilité et la biodégradation du fluoranthène par *Pseudomonas* (*Sphingomonas*) *paucimobilis* EPA 505. Guerin et Jones (1988b) étudiaient la minéralisation du phénanthrène par un *Mycobacterium* avec l'aide de plusieurs types de Tween (20, 40, 60, 80 et 85) possédant tous des EHL différentes. En règle générale, les surfactants plus lipophiles solubilisait plus efficacement le phénanthrène en étant néanmoins plus toxiques (Tiehm, 1994).

Aronstein et al. (1991, 92, 93) ont étudié l'effet de faibles concentrations (sous la CMC) de surfactants synthétiques non-ioniques, l'Alfonic 810-60 et le Novell II 1412-565, sur la désorption et la biodégradation du phénanthrène et du biphényle. Ces expériences furent effectuées avec une communauté bactérienne mixte dans des suspensions eau-sol contenant différentes concentrations de matière organique. L'ajout de très faibles concentrations de surfactant a favorisé la minéralisation du phénanthrène, sans toutefois augmenter la désorption du contaminant. Laha et Luthy (1991, 1992) ont, au contraire, trouvé que plusieurs surfactants non-ioniques favorisaient la désorption du phénanthrène dans des suspensions de sol mais inhibaient la minéralisation.

Tiehm (1994) a démontré le potentiel de certains surfactants synthétiques non-ioniques à augmenter la dégradation du fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène par *Mycobacterium* sp. BB1. Par exemple, en présence de Marlipal 013/90 une croissance exponentielle avec le phénanthrène ou le fluoranthène indiquait que la biodégradation n'était pas limitée par la biodisponibilité. Les surfactants trop lipophiles étaient toxiques pour la bactérie.

L'aide à la restauration de lieux contaminés par des résidus pétroliers par le fertilisant oléophile Inipol EAP 22 est habituellement attribuée à son rôle de source de phosphore et d'azote (Lindstrom et al., 1991). Toutefois, ce fertilisant est constitué d'une micro-émulsion d'urée (N) et de lauryl phosphate (P) dans de l'acide oléique stabilisée par de faibles quantités de 2-butoxy-1-éthanol. L'Inipol EAP 22 contient donc des éléments lui conférant une activité tensioactive. Une étude récente a effectivement démontré que son rôle de surfactant contribuait à favoriser la biodégradation d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques par des bactéries en cultures pures (Churchill et al., 1995).

#### **6.3.4. Inconvénients**

Les surfactants jouent un rôle important dans une grande variété d'applications industrielles comme l'émulsion, le moussage, le nettoyage, le mouillage et la solubilisation. On les utilise de plus en plus pour augmenter l'efficacité du traitement des sols contaminés par des

hydrocarbures (Vigon et Rubin, 1989; West et Harwell, 1992; Ducreux et al., 1994). Quoique très intéressante, l'utilisation de surfactants synthétiques pose toutefois plusieurs problèmes:

- Toxicité (polluants potentiels et aussi inhibition des micro-organismes);
- Biodégradabilité souvent difficile;
- Coûts d'utilisation élevés;
- Faible spécificité;
- Dispersion incontrôlée des contaminants (Jain et al., 1992; Van Dyke et al., 1993b);
- Adsorption au sol (Liu et al., 1992);
- Colmatage des pores du sol, etc.;

Le potentiel qu'ont les surfactants d'accroître la biodisponibilité des substrats insolubles rend très intéressante leur utilisation pour optimiser la biodégradation des HAP. On comprend de mieux en mieux leur mode d'action et leurs limites. Malgré quelques succès, les nombreux désavantages des surfactants synthétiques exigent cependant qu'on leur trouve une alternative.

## **7. BIOSURFACTANTS**

Les biosurfactants constituent un groupe hétérogène de molécules tensioactives synthétisées par certains micro-organismes. Leurs propriétés ont été largement étudiées (Zajic et Seffens, 1984; Rosenberg, 1986; Haferburg et al., 1986; Hommel, 1990; Fiechter, 1992; Georgiou et al., 1992; Kosaric, 1993; Banat, 1995).

L'intérêt pour les biosurfactants a débuté à la fin des années '60 quand on a voulu utiliser des hydrocarbures comme substrat économique pour produire des protéines d'origine unicellulaire (POU). On a remarqué que la productivité maximale était obtenue quand la surface interfaciale entre l'eau et l'huile était maximale, i.e. par émulsion. On a ainsi découvert que la plupart des micro-organismes utilisant les alcanes produisaient des substances émulsifiantes (Hommel, 1990).

Toutefois, plusieurs micro-organismes peuvent aussi synthétiser des biosurfactants lorsque cultivés sur des substrats solubles.

### **7.1. Définition et classification**

Une grande variété de molécules d'origine biologique peut se concentrer à l'interface entre des phases immiscibles (Georgiou et al., 1992). Par exemple, plusieurs protéines ont une activité tensioactive grâce à la structure amphiphile des hélices  $\alpha$ . Ainsi, certains polypeptides jouent un rôle de surfactants, comme les surfactants cellulaires présents au niveau des alvéoles pulmonaires qui assurent un échange gazeux normal. Parfois, la surface cellulaire peut elle-même manifester une certaine activité interfacielle (Zajic et Seffens, 1984). Dans le cadre de nos recherches, les lipides amphiphiles produits extracellulairement par des micro-organismes nous intéressent plus particulièrement.

À cause de leur activité émulsifiante, les biosurfactants et les bioémulsifiants sont souvent confondus. Pourtant, ils diffèrent autant dans leurs structures que dans leurs activités: seuls les biosurfactants peuvent diminuer la tension superficielle et former des micelles. La composition des bioémulsifiants consiste généralement en une mixture de bio-polymères plus ou moins définies, semblable à la structure des capsules et parois cellulaires microbiennes (Hommel, 1990). L'émulsifiant biologique le plus connu est l'émulsane, un hétéropolysaccharide polyanionique produit par *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (Rosenberg et al., 1979). Au contraire, les biosurfactants ont généralement une structure bien déterminée. La plupart sont neutres ou chargées négativement. Habituellement, leur pôle hydrophile se compose de mono-, di- ou polysaccharides, d'acides carboxyliques, d'acides aminés ou de peptides. Des acides gras saturés, non-saturés ou hydroxylés forment le pôle hydrophobe (Georgiou et al., 1992). Puisque les bioémulsifiants devraient n'avoir que peu d'impact sur un substrat solide comme des HAP, seuls les micro-organismes produisant des substances tensioactives représentaient un intérêt réel dans le cadre de nos travaux.

Plusieurs types de biosurfactants ont été isolés et caractérisés (Tableau 3; Georgiou et al., 1992; Rosenberg, 1993; Banat, 1995). La classification des biosurfactants est basée sur leurs structures, plutôt que sur la charge comme c'est le cas pour les surfactants synthétiques (Parra et al., 1989):

- glycolipides;
- lipopeptides ou lipoprotéines;
- phospholipides;
- acides gras et lipides neutres;

Les biosurfactants les plus étudiés sont les glycolipides et lipopeptides (Figure 9).

## **7.2. Exemples de micro-organismes producteurs**

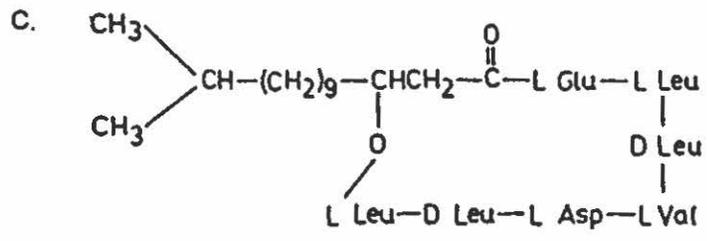
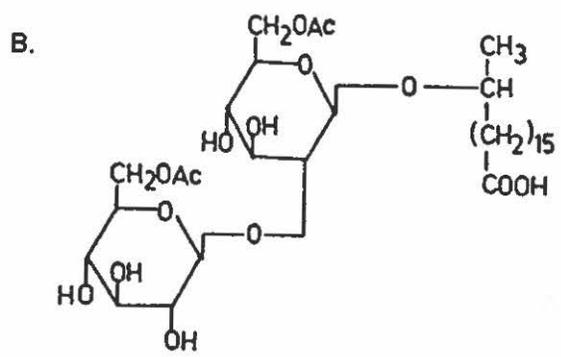
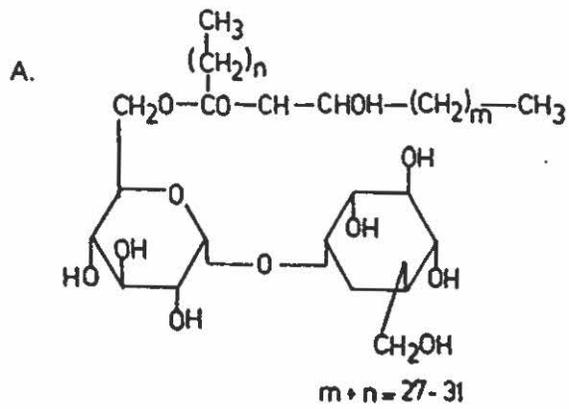
La plupart des substances possédant des propriétés surfactantes sont synthétisées par des micro-organismes croissant sur des substrats peu hydrosolubles, principalement des alcanes linéaires (Zajic et Seffens, 1984; Hommel, 1990). Ils ont souvent été isolés de lieux contaminés par de l'huile et des résidus pétroliers (Banat, 1995) comme des réservoirs usagés (Rocha et al., 1992; Bock et al., 1994), des sols contaminés (Abu-Ruwaida et al., 1991) ou des déversements accidentels (Shafeeq et al., 1989). On retrouve autant de variations dans les micro-organismes producteurs que dans les structures des biosurfactants (Tableau 3).

Parmi les genres bactériens utilisant des alcanes comme substrat, une grande proportion produit des biosurfactants ou des bioémulsifiants. Par exemples: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* et *Candida* (Haferburg et al., 1986). La plupart des micro-organismes produisent des mélanges de biosurfactants structurellement apparentés.

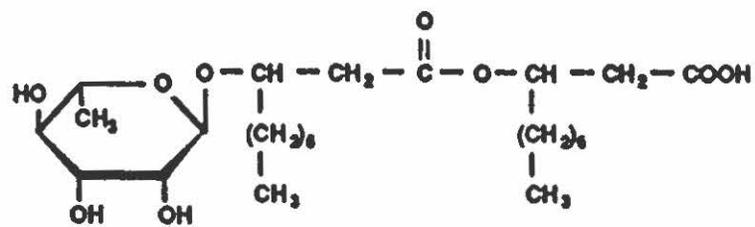
TABLEAU 3. Quelques biosurfactants et les micro-organismes qui les produisent.

Biosurfactants	Micro-organismes
Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i>
Trehalose mycolates	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Rubiwettines	<i>Serratia rubidaea</i>
Glycolipides	<i>Torulopsis apicola</i>
Glycolipides	<i>Rhodococcus aurantiacus</i>
Mannosylérrhritol lipides	<i>Candida antartica</i>
Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lipopeptides	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettine	<i>Serratia marcescens</i>
Acides gras	<i>Corynebacterium lepus</i>
Phosphatidyléthanolamine	<i>Rhodococcus erythropolis</i>

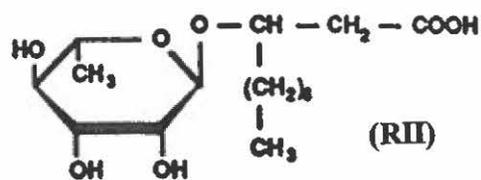
**FIGURE 9:** Structure de quelques biosurfactants (Hommel, 1990). [A] Trehalose-6-monocorynomycolate de *Rhodococcus erythropolis*. [B] Sophoroselipide (forme acide) de *Torulopsis bombicola*. [C] Surfactine de *Bacillus subtilis*.



**FIGURE 10:** Différentes formes de rhamnolipides (biosurfactants) synthétisés par *Ps. aeruginosa* DSM 2659 (Fiechter, 1992).

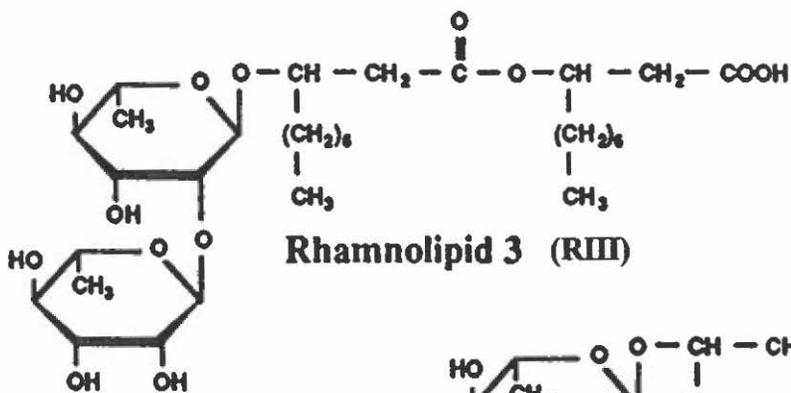


**Rhamnolipid 1 (RI)**

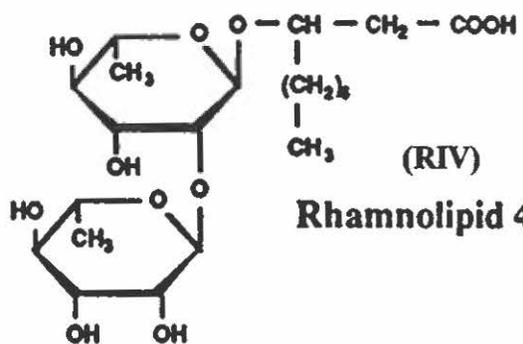


(RII)

**Rhamnolipid 2**



**Rhamnolipid 3 (RIII)**



(RIV)

**Rhamnolipid 4**

### 7.2.1. Rhamnolipides de *Ps. aeruginosa*

On sait depuis longtemps que *Ps. aeruginosa* produit un glycolipide extracellulaire (Jarvis et Johnson, 1949). L'étude de sa structure et sa synthèse ont démontré qu'il s'agit d'un rhamnolipide (Edwards et Hayashi, 1965; Burger et al., 1963).

Des analyses ont permis d'identifier les deux principaux rhamnolipides produits par *Ps. aeruginosa* KY 4025 (Itoh et al., 1971), 44T1 (Parra et al., 1989) et UG2 (Van Dyke et al., 1993a) comme étant le  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxydécanoyl- $\beta$ -hydroxydécanoate (R I) et le 2-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl- $\beta$ -hydroxy-décanoyl- $\beta$ -hydroxydécanoate (R III).

Toutefois, plusieurs variations de ces structures initiales ont été trouvées (Figure 10). Syldatk et al. (1985) ont ainsi isolé deux autres rhamnolipides, lesquels ne possèdent qu'un seul acide gras (R II et R IV). Deux formes similaires à R I et R III mais avec une portion décenoyle liée en position 2' et 2'' des mono- et di-rhamnosyle ont également été décrites (Yamaguchi et al., 1976), tandis que Rendell et al. (1990) ont purifié des rhamnolipides homologues contenant des acides gras C<sub>8</sub>, C<sub>12</sub> ou C<sub>12:1</sub>.

## 7.3. Caractéristiques des biosurfactants

### 7.3.1. Générales

Les propriétés physico-chimiques des biosurfactants comme la diminution de la tension superficielle et interfacielle, la formation d'agrégats et de micelles, la tolérance à la chaleur et au pH se comparent aux surfactants synthétiques (Georgiou et al., 1992). Ils possèdent cependant plusieurs avantages supplémentaires:

- Biodégradables (Oberbremer et al., 1990);
- Peu ou non-toxiques (Van Dyke et al., 1991);
- CMC souvent inférieure;

- Grande diversité structurelle;
- Spécificité pour le substrat (Banarjee et al., 1983; Falatko et Novak, 1992; Desai et al., 1988; Francy et al., 1991);
- Efficacité en conditions extrêmes de pH et de température (Müller-Hurtig et al., 1993);
- Effet de stimulation de la dégradation souvent limité à l'organisme producteur (Haferburg et al., 1986; Müller-Hurtig et al., 1993; Hisatsuka et al., 1971; Itoh et Suzuki, 1972);
- Variété de structures et caractéristiques;
- Possibilité de production à partir de substrats renouvelables;
- Possibilité de les modifier biologiquement ou chimiquement;

### **7.3.2. Quelques caractéristiques des rhamnolipides de *Ps. aeruginosa***

Chacunes des formes de rhamnolipides possèdent des propriétés différentes. Des variations du pH ou de la composition ionique du solvant affectent la tension superficielle et interfacielle (Parra et al., 1989), ainsi que les CMC (Tableau 4). Les variations du pH vont également affecter l'agrégation des molécules de rhamnolipides. Tout dépendant du pH, elles formeront des micelles, des lamelles ou des vésicules (Figure 7), chacune ayant des propriétés différentes (Ishigami et al., 1987, 1993).

### **7.4. Biosynthèse**

Il semblerait que les biosurfactants soient des métabolites secondaires, comme les antibiotiques (Hommel et Ratledge, 1993). Les métabolites secondaires sont des substances produites par des micro-organismes, à partir d'intermédiaires accumulés lors du métabolisme primaire (précurseurs), et qui ne seraient pas essentielles à sa survie. Leur production commence à la fin de la phase de croissance exponentielle car les enzymes impliqués dans la biosynthèse sont normalement réprimés dans les cellules en pleine croissance (Behal, 1986).

**TABLEAU 4.** Variations des propriétés des différentes formes de rhamnolipides de *Pseudomonas* sp. DSM 2874 à 40°C (Syldatk *et al.*, 1985).

Surfactant	Solvant	Tension superficielle minimale (mN/m)	CMC (mg/l)	Tension interfacielle minimale <sup>a</sup> (mN/m)	CMC (mg/l)
extrait brute <sup>b</sup> contenant rhamnolipides I et III	eau distillée	26	25	<1	80
	solut. 5% NaCl	26	10	<1	15
	eau minérale <sup>c</sup>	26	20	<1	20
	tampon pH 3 <sup>d</sup>	27	10	<1	20
	tampon pH 9 <sup>d</sup>	27	20	<1	20
extrait brute <sup>e</sup> contenant rhamnolipides I à IV	eau distillée	27	25	<1	20
	eau minérale <sup>c</sup>	28	20	<1	6
rhamnolipide I	eau distillée	31	20	8	100
	solut. 5% NaCl	26	15	<1	30
	eau minérale <sup>c</sup>	26	20	4	40
	tampon pH 3 <sup>d</sup>	26	2	<1	40
	tampon pH 9 <sup>d</sup>	26	20	<1	20
rhamnolipide II	eau minérale <sup>c</sup>	25	200	<1	200
rhamnolipide III	eau distillée	31	20	3	20
	solut. 5% NaCl	28	10	<1	10
	eau minérale <sup>c</sup>	27	10	<1	5
	tampon pH 3 <sup>d</sup>	28	10	<1	5
	tampon pH 9 <sup>d</sup>	30	40	3	30
rhamnolipide IV	eau minérale <sup>c</sup>	30	200	<1	200

<sup>a</sup> contre l'hexadécane.

<sup>b</sup> après enlèvement des *n*-alcanes non-utilisés comme substrat.

<sup>c</sup> composition: NaCl, 100 g/l; CaCl<sub>2</sub>, 18 g/l; MgCl<sub>2</sub>, 10g/l.

<sup>d</sup> tampon Teorell-Stenhagen, supplémenté avec NaCl, 10% (p/v).

<sup>e</sup> glycérol comme substrat.

#### 7.4.1. Conditions

La quantité de biosurfactants produite est influencée par la nature du substrat carboné utilisée (Georgiou et al., 1992). La source de carbone affecte la structure, et donc les propriétés, des biosurfactants (Fiechter, 1992) et pourrait aussi déterminer s'ils seront extracellulaires ou associés à la membrane. La productivité et la structure sont aussi affectées par la concentration d'azote, de phosphore, de magnésium, de fer et de manganèse dans le milieu de culture (Guerra-Santos et al., 1984 et 1986; Haferburg et al., 1986), et par les conditions de culture comme le pH, la température et l'agitation (Guerra-Santos et al., 1984 et 1986; Abu-Ruwaida et al., 1991; Fiechter, 1992; Lin et al., 1994).

Le choix de la source de carbone joue un rôle déterminant dans la productivité et la structure des biosurfactants. Les micro-organismes produisant des biosurfactants peuvent être séparés en trois groupes: [1] Certains produisent des biosurfactants seulement quand ils sont cultivés sur des hydrocarbures (*n*-alcanes), comme *Rhodococcus aurantiacus* qui fabrique une mixture de quatre glycolipides lorsque cultivée sur l'hexadécane (Ramsay et al., 1988). [2] D'autres ne peuvent en produire que sur des substrats solubles comme du glucose, sucrose, glycérol, éthanol ou des acides aminés. Par exemple *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 (Mulligan et Gibbs, 1989; Zhang et Miller, 1992). [3] Enfin, des bactéries comme *Ps. aeruginosa* PG201, UG2 ou 44T1 en produisent autant sur des substrats solubles ou insolubles (Guerra-Santos et al., 1984; Robert et al., 1989; Berg et al., 1990).

Les conditions spécifiques favorisant la productivité ont été déterminées pour plusieurs micro-organismes. Par exemple, la concentration de fer ou de manganèse affecte la production de surfactine par *Bacillus subtilis* (Georgiou et al., 1992). Un brusque changement de pH ou de température induit une surproduction de biosurfactants par *Rhodococcus erythropolis* lors de la culture sur un alcane (Kim et al., 1990).

#### 7.4.2. Voies biosynthétiques: génétique et régulation

Les voies métaboliques de synthèse sont aussi variées que les structures de biosurfactants (Haferburg et al., 1986). Les rares études portant sur la régulation de la biosynthèse des biosurfactants au niveau moléculaire suggèrent des mécanismes de complexité élevée (Georgiou et al., 1992). Le lecteur est invité à consulter la revue de Reiser et al. (1993).

##### 7.4.2.1. Rhamnolipides de *Ps. aeruginosa*

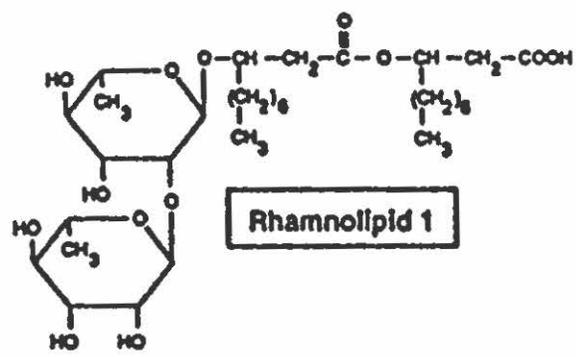
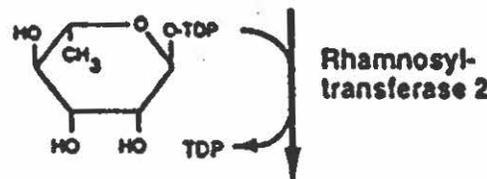
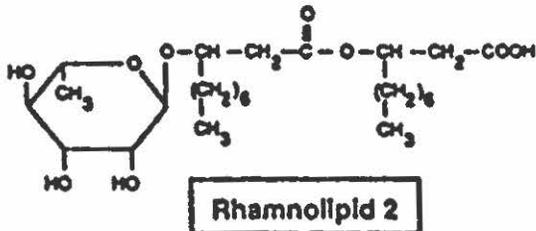
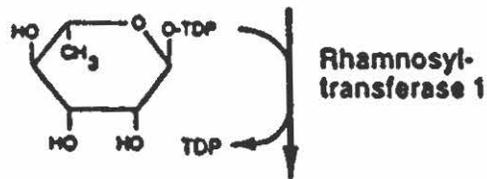
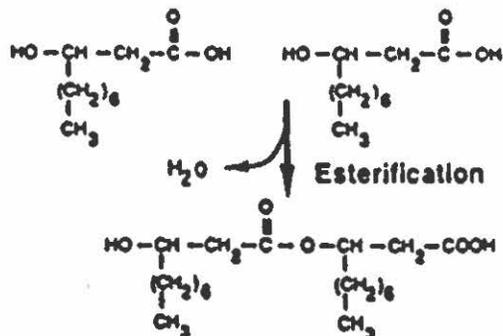
Les mécanismes de la biosynthèse des rhamnolipides par *Ps. aeruginosa* sont les plus étudiés (Ochsner et al., 1995c). Des ratios C:N (Guerra-Santos et al., 1984; Venkata Ramana et Karanth, 1989) ou C:P (Mulligan et al., 1989) élevés favorisent la production de rhamnolipides, alors que de fortes concentrations de cations bivalents l'inhibent. La limitation de la croissance par un manque de fer provoque une augmentation particulièrement importante de la sécrétion de rhamnolipides (Guerra-Santos et al., 1986). Il y aurait également une corrélation entre l'augmentation de l'activité de la glutamine synthétase et la production de biosurfactants. Ainsi, une concentration élevée d'ammonium et de glutamine diminuerait la sécrétion de biosurfactants (Mulligan et Gibbs, 1989).

La voie biosynthétique des rhamnolipides a été largement élucidée (Burger et al., 1963, 1966; Ochsner et al., 1994b; Figure 11). Quoique quatre structures différentes aient été identifiées (Figure 10), les rhamnolipides R1 et R3 sont les principaux glycolipides produits en cultures liquides, le mono-rhamnolipide étant le précurseur du di-rhamnolipide.

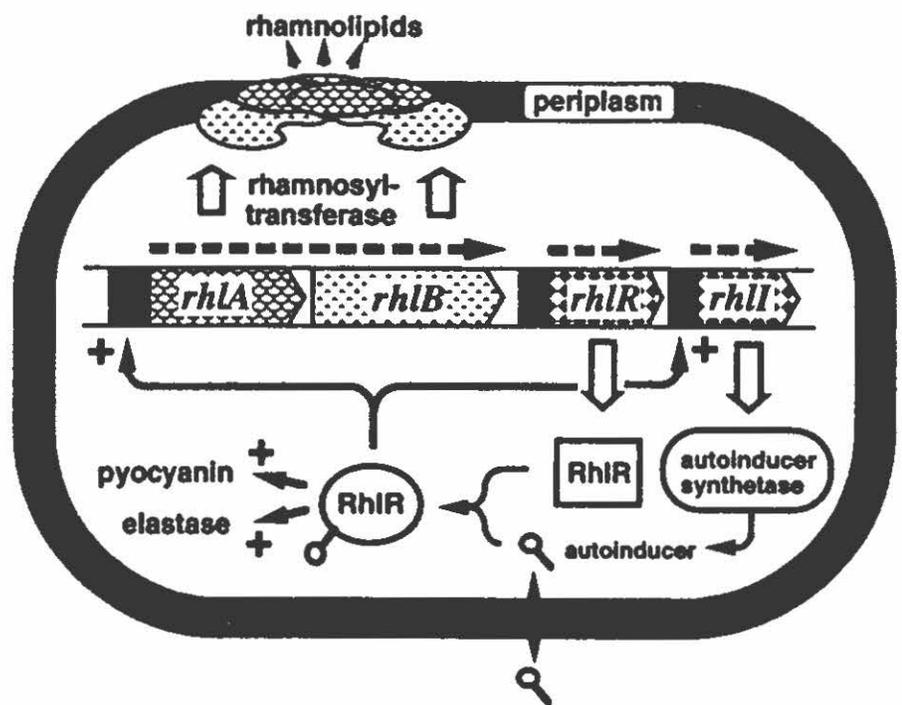
Les gènes impliqués dans la biosynthèse des rhamnolipides ont été isolés et caractérisés par Ochsner et al., (1994a, 1994b, 1995a, 1995b) (Figure 12). En 1991, Koch et al. ont sélectionné un mutant de *Ps. aeruginosa* PG201 qui avait perdu la capacité de croître sur l'hexadécane en l'absence de rhamnolipides dans le milieu de culture. Ce mutant ne produit plus de biosurfactants, ni d'activité de la rhamnosyltransférase 1 (codée par les gènes *rhIAB*; Ochsner et al., 1994b). Il a été démontré qu'un gène régulateur (*rhIR*) codant pour un activateur transcriptionnel a été affecté

(Ochsner et al., 1994a). Il a également été déterminé que la protéine régulatrice RlhR doit être activée par un autoinducteur, le produit d'une synthétase codée par le gène *rhII* (Ochsner et al., 1995a).

**FIGURE 11.** Voie biosynthétique de la production des rhamnolipides par *Ps. aeruginosa*  
(Ochsner et al, 1995b).



**FIGURE 12.** Modèle de la régulation de la production de rhamnolipides chez *Pseudomonas aeruginosa* (Ochsner et al., 1995a). Les gènes *rhIA* et *rhIB* codent pour la rhamnosyltransférase responsable de la synthèse des rhamnolipides. Le gène régulateur *rhIR* code pour un activateur transcriptionnel. Ce régulateur doit être activé par un autoinducteur diffusible, produit d'une synthétase codée par le gène *rhII*.



## **7.5. Rôle physiologique**

### **7.5.1. Production de biosurfactants vs assimilation de substrats peu biodisponibles**

En 1971, Hisatsuka et al. ont étudié une substance produite par une souche de *Ps. aeruginosa* qui stimulait la croissance sur le *n*-hexadécane. La substance avait des propriétés tensioactives et émulsionnantes et fut identifiée comme un rhamnolipide. Puis, Itoh et Suzuki (1972) ont trouvé qu'un mutant d'une souche de *Ps. aeruginosa* ne pouvait plus croître sur la *n*-paraffine depuis qu'il avait perdu sa capacité de produire du biosurfactant, et que la croissance était restaurée par l'ajout de rhamnolipides provenant de la souche originale. Toutefois, l'ajout de tréhalose lipides, un biosurfactant non produit par *Ps. aeruginosa*, n'eut aucun effet stimulateur, suggérant la spécificité possible de ces biosurfactants. Des biosurfactants furent détectés dans le milieu de culture de *Ps. aeruginosa* S8 lors de la dégradation de différents alcanes (Shafeeq et al., 1989). Oberbremer et Muller-Hurtig (1989) ont étudié la biodégradation d'une mixture d'hydrocarbures en réacteurs contenant une suspension sol-eau. Le naphthalène fut dégradé lors de la première phase, mais la dégradation de la plupart des autres composés moins solubles eut lieu durant une seconde phase, après que la production de biosurfactants ait diminué la tension interfacielle.

Depuis, la littérature souligne le lien entre la croissance microbienne sur des substrats insolubles, surtout les alcanes linéaires et autres huiles, et la production de biosurfactants (Hommel, 1990). L'habileté des biosurfactants à émulsifier des mixtures d'eau et d'hydrocarbures a été fréquemment observée (e.g. Harvey et al., 1990; Oberbremer et al., 1990; Zhang et Miller, 1992 et 1994; Churchill et al., 1995) et l'effet stimulateur sur la croissance de l'ajout de surfactants biologiques ou synthétiques a été démontré (Haferburg et al., 1986). La production exclusive ou supérieure de biosurfactants, ou de bioémulsifiants, lors de la croissance sur des alcanes suggère fortement qu'ils puissent avoir un rôle à jouer dans l'assimilation de substrats faiblement disponibles.

Des micro-organismes produisant des biosurfactants et bioémulsifiants se retrouvent en plus grande concentration dans les sites contaminés par des hydrocarbures que dans les sols non-contaminés (Parra et al., 1989). Il semblerait également que favoriser la biodégradation des hydrocarbures avantage les micro-organismes producteurs de biosurfactants et bioémulsifiants (Francy et al., 1991).

Toutefois, la production de biosurfactants ou de bioémulsifiants à partir de substrats aromatiques a été très rarement rapportée. Cooper et al. (1981) ont observé une faible diminution de la tension superficielle lors de la croissance de plusieurs souches de *Pseudomonas* sur du xylène. *Ps. aeruginosa* UG2 aurait démontré une certaine activité émulsifiante lors de la croissance sur le naphthalène (Berg et al., 1990). *Ps. cepacia* AC1100 dégrade l'acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T), un herbicide chlorée insoluble, en produisant un émulsifiant (Banarjee et al., 1983). Ce dernier adhérerait à la cellule pendant la croissance exponentielle et serait libéré dans le milieu de culture au début de la phase stationnaire. Les chercheurs ont proposé que ce bioémulsifiant puisse jouer un rôle dans le transport du substrat dans la cellule.

### 7.5.2. Mécanismes d'action

La grande majorité des études concernant la production de biosurfactants et bioémulsifiants par des micro-organismes croissant sur un hydrocarbure sont reliées à l'utilisation des alcanes linéaires. Deux types de mécanismes ont été proposés pour expliquer le rôle des biosurfactants dans la dégradation des alcanes (Hommel, 1990). Les biosurfactants ioniques extracellulaires, comme les rhamnolipides et les sophorolipides, émulsionnent (pseudosolubilisent) le substrat aliphatique le rendant plus biodisponible par augmentation de la surface d'échange. Il arrive toutefois que les molécules de biosurfactants restent attachées à la paroi cellulaire et la rendent hydrophobe, ce qui pourrait faciliter le contact avec les hydrocarbures et faciliter leur diffusion dans la cellule (Haferburg et al., 1986; Fiechter, 1992).

L'adhérence des micro-organismes, dont l'hydrophobicité de la surface cellulaire est un indicateur important (Van Loosdrecht et al., 1987), a été proposée comme un prérequis pour la croissance sur des hydrocarbures liquides dans deux circonstances: une faible densité cellulaire et une émulsion limitée (Rosenberg et Rosenberg, 1981). Goswami et Singh (1991) ont rapporté que deux bactéries utilisant l'hexadécane privilégiaient des moyens différents: une impliquant l'adhérence et l'autre l'émulsion.

Il semble probable qu'il y ait un lien entre les biosurfactants et l'hydrophobicité de la paroi cellulaire. Zhang et Miller (1994) ont étudié quatre souches de *Ps. aeruginosa* métabolisant l'octadécane. Les deux souches ayant une paroi très hydrophobe dégradent l'octadécane, un alcane solide à la température de la pièce, beaucoup plus rapidement que les souches faiblement hydrophobes. L'addition de rhamnolipides purifiés dans les milieux de cultures a augmenté la biodégradation de l'octadécane par solubilisation. Toutefois, l'activité catabolique des souches moins performantes a été davantage stimulée par le biosurfactant, ce qui fut attribuée à l'accroissement de l'hydrophobicité de leur paroi.

Alors que l'activité émulsifiante est facilement observable, l'habileté des biosurfactants à accroître l'hydro-solubilité et la biodégradation des hydrocarbures solides a rarement été démontrée expérimentalement. Zhang et Miller (1992) ont stimulé la biodégradation de l'octadécane par *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 en ajoutant des rhamnolipides produits par la même souche avant lors de la croissance sur du glucose. Hunt et al. (1994) ont mesuré une augmentation de la solubilité apparente du phénanthrène par l'addition de rhamnolipides produits par *Ps. aeruginosa* PRP652 sur du glycérol.

## **7.6. Applications**

L'importance croissante pour les industries de choisir des produits plus compatibles avec l'environnement amènera éventuellement le remplacement des surfactants synthétiques (marché de 6 milliards \$ US en 1989). L'industrie s'intéresse de plus en plus aux biosurfactants comme

substitut potentiel (Georgiou et al., 1992). Les surfactants biologiques ont l'avantage de présenter une grande variété de propriétés physico-chimiques potentiellement intéressantes pour des besoins spécifiques (Georgiou et al., 1992).

#### 7.6.1. «Microbially-Enhanced Oil Recovery» (MEOR)

La capacité des biosurfactants à désorber et solubiliser des hydrocarbures retenus dans des sols a été démontrée. Des colonnes remplies de sable saturé avec de l'huile brute ont été lavées avec des solutions de biosurfactants (Banat, 1995; Abu-Ruwaida et al., 1991). La portion désorbée mesurée pouvait atteindre jusqu'à 95 % de l'huile résiduelle par rapport à un traitement avec de l'eau (Banat, 1993). Plusieurs études ont déterminé l'efficacité des rhamnolipides de *Ps. aeruginosa* UG2 à désorber divers hydrocarbures aliphatiques et aromatiques de différents types de sols (Van Dyke et al., 1993b; Scheibenbogen et al., 1994). L'habileté de différents biosurfactants et bioémulsifiants à solubiliser de l'hexachlorobiphényle mélangé à un sol dans des tubes à centrifugation a été aussi démontrée (Van Dyke et al., 1993b). Également, les rhamnolipides de *Ps. aeruginosa* SB30 ont réussi à laver du gravier contaminé par de l'huile lors du déversement de l'Exxon Valdez en Alaska (Harvey et al., 1990), ce qui démontre l'efficacité des biosurfactants à enlever des hydrocarbures de sols naturellement contaminés.

La «Microbially-Enhanced Oil Recovery» (MEOR) est une technique de récupération tertiaire suscitant beaucoup d'intérêt depuis de nombreuses années (Banat, 1995). Cette application de la production de biosurfactants, l'une des mieux documentées, consiste à employer des bioémulsifiants et biosurfactants pour récupérer les résidus d'huiles retenus dans des réservoirs de stockage. Les biosurfactants peuvent être produits dans des réacteurs et introduits par pompage, ou produits *in situ* par des micro-organismes producteurs déjà présents ou inoculés. On doit simplement ajouter les nutriments inorganiques nécessaires à la croissance et peut-être aussi un substrat facilement assimilable pour la production du biosurfactant (Van Dyke et al., 1991). Les micro-organismes doivent survivre dans des conditions difficiles comme des

température et pression élevées (Khire et Khan, 1994). Le nettoyage des ballasts et réservoirs de pétroliers contenant des résidus huileux serait réalisable par une technologie similaire (Gutnick et Rosenberg 1977; Banat et al., 1995).

## **7.6.2. Biodégradation des hydrocarbures**

### **7.6.2.1. Addition de biosurfactants**

Plusieurs travaux ont démontré que l'ajout de biosurfactants peut stimuler la biodégradation d'hydrocarbures. Dès 1971, Hisatsuka et al. avait observé que l'addition de rhamnolipides à la souche productrice de biosurfactants *Ps. aeruginosa* S<sub>7</sub>B<sub>1</sub> stimulait sa croissance sur l'hexadécane. Oberbremer et al. (1990) ont étudié les effets d'ajout de biosurfactants, de type sophorolipides, sur la dégradation d'une mixture d'hydrocarbures aromatiques et aliphatiques dans une suspension sol-eau. La période de latence avant le début de la biodégradation fut raccourcie et la dégradation plus complète. À la fin, les biosurfactants étaient également complètement dégradés. Jain et al. (1992) ont observé une augmentation de la biodégradation d'un mélange de tétradécane, d'hexadécane, de pristane et de 2-méthyl-naphtalène dans du sol quand des rhamnolipides de *Ps. aeruginosa* UG2 étaient ajoutés. Seule la biodégradation de ce dernier n'a pas été améliorée. Zhang et Miller (1992) ont trouvé qu'ajouter du biosurfactant produit par *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 améliorerait la dispersion et la minéralisation de l'octadécane dans une culture en milieu liquide.

Les biosurfactants pourront éventuellement servir à augmenter le taux de la biodégradation des hydrocarbures polluant l'environnement (Bertrand et al., 1994), en remplaçant les surfactants synthétiques lors de la biorestauration de lieux contaminés.

### **7.6.2.2. Ensemencement avec souche productrice de biosurfactants**

Quelques tentatives ont eu lieu afin de déterminer si l'ensemencement avec un micro-organisme producteur de biosurfactants pourrait remplacer l'ajout de biosurfactant purifié. Lors

d'un premier essai, *Rhodococcus erythropolis* DSM 43215, producteur de 6,6-tréhalosedicorynomycolates, fut inoculé dans une suspension d'eau et de sol possédant une population adaptée à la dégradation d'une mixture d'hydrocarbures (Goclik et al., 1990). L'augmentation de la dégradation observée fut toutefois attribuée à la bactérie elle-même et non à son biosurfactant. L'explication avancée était que les biosurfactants produits restaient associés à la membrane et donc non-disponibles pour aider les autres micro-organismes.

Jain et al. (1992) ont entrepris de comparer l'effet de l'ensemencement avec *Ps. aeruginosa* UG2 à l'addition de son biosurfactant seul sur la biodégradation d'une mixture d'hydrocarbures dans un sol. L'inoculation de jusqu'à  $10^8$  cellules de UG2 par gramme de sol n'eut aucun effet significatif sur la biodégradation, contrairement à l'ajout de rhamnolipides. Les explications proposées: la mort des bactéries UG2 et la non-production de biosurfactants.

Récemment, une étude a démontré une plus grande biodégradation du phénanthrène ajouté à un sol contaminé avec de la créosote en présence de *Ps. aeruginosa* UG2Lr et d'une souche dégradatrice de phénanthrène *Pseudomonas* sp. UG14r (Providenti et al., 1995). Néanmoins, on ne sait pas si UG2Lr produisait du biosurfactant.

L'utilisation des biosurfactants dans la biorestauration est un sujet original qui comporte un potentiel d'application élevé. Puisque le seul lien entre les multiples micro-organismes producteurs de biosurfactants est la synthèse de molécules ayant des propriétés communes, beaucoup de recherche reste à accomplir.

## **8. CONCLUSION**

Le défi que représente la biorestauration de sites contaminés par des polluants très récalcitrants comme les HAP nécessite l'étude de nouvelles approches.

La faible biodisponibilité des HAP représente un facteur limitant fondamental, et par conséquent l'emploi de composés solubilisants est suggéré comme moyen de favoriser la biodégradation. Les biosurfactants possèdent plusieurs avantages comparativement aux

surfactants synthétiques. Ils sont souvent plus efficaces et spécifiques, et également biodégradables. L'utilisation des biosurfactants pour la biorestauration apparaît prometteuse (Dutton, 1993). Il semblerait que les micro-organismes adaptés présents dans des sites contaminés et capables de produire des biosurfactants pourraient mieux effectuer la biorestauration (Banat, 1995). La fonction et le métabolisme des biosurfactants restent cependant peu connus.

La production de biosurfactants par les micro-organismes déjà présents dans le site contaminé a été proposée (Bertrand et al., 1994; Van Dyke et al., 1991; Francy et al., 1991) mais jusqu'à maintenant très peu étudiée. Bien que les biosurfactants soient souvent produits par des micro-organismes croissant sur des hydrocarbures aliphatiques (Hommel, 1990), à ce jour, la production de ces substances à partir d'hydrocarbures aromatiques comme les HAP n'a jamais été rapportée dans la littérature. En effet, les rares tentatives portant sur l'étude des bactéries dégradant des HAP pour leur capacité à produire des biosurfactants ont été infructueuses (Volkering et al., 1993; Stringfellow et Aitken, 1994). L'isolement de micro-organismes démontrant la capacité de produire des biosurfactants en utilisant des HAP comme seule source de carbone et d'énergie permettrait d'évaluer l'importance des biosurfactants dans la biodégradation des substrats peu biodisponibles.

## **HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE LA RECHERCHE**

## **1. HYPOTHÈSES**

Puisque la majorité des biosurfactants et bioémulsifiants identifiés sont produits par des micro-organismes métabolisant des hydrocarbures aliphatiques et que la littérature récente s'accorde pour dire qu'ils sont avantagés par cette capacité métabolique ;

puisque certains micro-organismes peuvent croître sur des HAP, alors que ces polluants sont reconnus hautement récalcitrants à la biodégradation ;

il existerait possiblement une corrélation entre la capacité de métaboliser des HAP et la capacité de produire des biosurfactants. Les bactéries dégradant les HAP produiraient des biosurfactants, un mécanisme par lequel les HAP seraient rendus plus biodisponibles.

## **2. OBJECTIFS**

Pour vérifier cette hypothèse, la démarche expérimentale suivie a consisté à:

[1] Isoler des micro-organismes ou des consortia capables de dégrader des HAP à partir de sites contaminés.

[2] Déterminer le potentiel des souches isolées à produire (synthétiser et sécréter) du biosurfactant en utilisant un substrat facilement assimilable.

[3] Déterminer le potentiel à produire du biosurfactant en utilisant un HAP comme seul substrat.

[4] Étudier et optimiser la capacité à dégrader des HAP en déterminant les conditions qui favorisent la production de biosurfactants (est-ce que les conditions optimales pour la production de biosurfactants permettent la dégradation des HAP, et vice-versa).

Jusqu'à maintenant, aucun micro-organisme ayant la capacité de dégrader des HAP et de produire du biosurfactant n'a été rapporté dans la littérature scientifique (à notre connaissance):

[«however, microbes that produce biosurfactants and degrade PAHs have yet to be identified (...).»] (Wilson et Jones, 1993).

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## **1. PRODUITS CHIMIQUES ET MILIEUX DE CULTURE**

Les hydrocarbures suivants ont été obtenus de la compagnie Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.): naphthalène, biphenyle, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, dibenzothiophène, dibenzofurane, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, benz[a]anthracène chrysène et benzo[a]pyrène (tous d'une pureté supérieure à 97%, sauf l'acénaphthylène à 85%), ainsi que l'hexadécane utilisé pour les tests d'émulsion et d'hydrophobicité. Les hydrocarbures aromatiques étaient solubilisés dans l'acétone ou le dichlorométhane, fournis par Anachemia Science (Montréal, Qué.), tout comme l'éther diéthylique et le sulfate de sodium anhydre employés lors de l'extraction des HAP résiduels. Le pyrène et le surfactant cationique bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) provenaient de la compagnie Sigma Chemicals (St-Louis, MO). L'étalon interne pour les analyses aux GC-FID, le 9-méthylanthracène (Aldrich Chemical) possédait une pureté de 98%. Ont également été employés: indole (Aldrich Chemical), salicylate de sodium (Aldrich Chemical), dextrose, mannitol et glycérol (Mallinckrodt, Pointe-Claire, Qué.), les surfactants nonioniques Tween 80 (Sigma Chemicals) et Brij 35 (Aldrich Chemical).

Le milieu de sels minéraux utilisé pour les expériences de biodégradation était le Bushnell-Haas (BH; Difco Laboratories, Detroit, Mich.; Bushnell et Haas, 1941). Ce milieu est utilisé par plusieurs chercheurs pour l'étude de la dégradation microbienne des hydrocarbures (Mueller et al., 1991; Shafeeq et al., 1989; Janiyani et al., 1992). La composition du milieu BH est la suivante (g/l): 1,0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,0, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>; 0,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,05, FeCl<sub>3</sub>; 0,02, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O. Le BH était parfois additionné de 0,05% extrait de levure (Difco) (BHY), de 100 ppm salicylate de sodium (BHS) ou les deux (BHYS). Pour les milieux gélosés, de l'agar Bacto (Difco) était ajouté à 1,5 %.

Les souches bactériennes étudiées produisent du biosurfactant dans le milieu minéral BH, développé pour l'étude de la croissance bactérienne sur des hydrocarbures. Or, d'après la littérature, les conditions favorisant la biosynthèse des biosurfactants par *Ps. aeruginosa* diffèrent de celles favorisant la biodégradation. Ainsi, la production de biosurfactants est activée à la fin de

la phase de croissance exponentielle / début de la phase stationnaire car les biosurfactants sont généralement des métabolites secondaires. La "machinerie biosynthétique" est complètement activée lorsque des conditions de croissance limitantes sont atteintes, souvent par un ratio carbone : azote élevé, ou une limitation en phosphore ou en fer.

Afin de trouver un milieu plus favorable à la production de rhamnolipides, une comparaison de différents milieux déjà publiés (Venkata Ramana et Karanth, 1989; Syldatk *et al.*, 1985; Guerra-Santos *et al.*, 1986; De Andrés *et al.*, 1994; Robert *et al.*, 1989; Janiyani *et al.*, 1992; Persson et Molin, 1987; Van Dyke *et al.*, 1993a) a été effectuée. Ceci a permis de déterminer les sels minéraux les plus souvent utilisés, ainsi que les concentrations idéales. En résumé, un ratio molaire C:N au-dessus de 20 et une source d'azote sous forme de nitrate de sodium favorisent la production de surfactant alors que l'addition de fer la diminue nettement.

Le milieu de sels minéraux décrit par Siegmund et Wagner (1991) (milieu SW) intégrait bien les critères importants et fut donc retenu comme milieu optimal pour les expériences de production de biosurfactants. Sa composition est (g/l): 0,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,9,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 2,0,  $\text{NaNO}_3$ ; 0,4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Le milieu SW était parfois enrichi de 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (SWF).

Les milieux de croissance généralement utilisés étaient le milieu liquide Tryptic Soy Broth (TSB) et les géloses Tryptic Soy Agar (TSA) de Difco Laboratories.

## **2. MICRO-ORGANISMES**

Les bactéries étudiées au cours de ces travaux proviennent d'une sablière contaminée par des résidus pétroliers, ainsi que de sol prélevé à la base de poteaux de bois enduits d'un mélange préservatif à base d'hydrocarbures.

### **2.1. Souches Thouin**

Une banque de 84 isolats bactériens, provenant de réacteurs utilisés dans l'étude et l'optimisation de la biorestauration de la Sablière Thouin (située à L'Assomption, Qué.) (Paquette *et al.*, 1993b), a servi de source principale de micro-organismes au cours de ces travaux. Le sol de la Sablière Thouin est contaminé par des résidus pétroliers. L'isolement des bactéries avait été effectué lors du suivi des microflore hydrocarbonoclastes par la méthode du nombre le plus probable, avec de l'huile à chauffage (diésel).

### **2.2. Isolats et souches BDP**

Environ 250 g de sol contaminé recueilli à la base de poteaux de transport d'électricité (situés sur le boulevard des Prairies, Laval, Qué.) ajoutés à 600 ml de BH dans un Erlenmeyer de 2000 ml ont été incubés à 30°C sous une agitation de 150 rpm. Environ 100 ppm de fluoranthène et de pyrène ont été ajoutés sous forme de cristaux. Après dix jours d'incubation, des dilutions  $\times 10^3$  et  $\times 10^4$  de l'enrichissement ont été étalées, soit sur des géloses BHY puis recouvertes de fluorène, phénanthrène ou fluoranthène, soit sur géloses des BHYS puis recouvertes de fluoranthène (méthode par pulvérisation, section 4.2.2.). Les isolats 90 à 99 ont été prélevés sur les géloses recouvertes de fluoranthène, alors que les isolats 100 à 110 étaient sélectionnés sur les géloses avec fluorène. Ils ont été conservés sur des géloses TSA recouvertes de leur HAP d'isolement.

### **2.3. Souches de référence UG2 et PG201**

Deux souches de *Pseudomonas* productrices de biosurfactants ont été acquises pour servir de souches de référence: *Ps. aeruginosa* UG2 fut obtenue des Drs. Hung Lee et Jack Trevors de University of Guelph, Guelph, Ont., et *Ps. aeruginosa* PG201 a été fournie par le Dr. Jakob Reiser du Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Suisse. Ce sont les deux souches de

*Pseudomonas* productrices de biosurfactants les mieux documentées (Berg et al., 1990; Koch et al., 1991).

#### **2.4. Conservation des souches et isolats**

Les souches bactériennes étaient conservées sur des géloses inclinées de TSA dans des tubes de 50 ml. Après croissance suffisante, les cultures inclinées étaient pulvérisées avec une solution de phénanthrène dans l'acétone et entreposées à 4°C après volatilisation du solvant. Les inocula étaient préparés par l'ensemencement de géloses TSA et incubés à 29°C.

La conservation des isolats BDP s'effectua en cultures liquides additionnées de HAP. Des flacons de 500 ml contenant 50 ml de BHYS et 100 ppm de fluorène, phénanthrène et fluoranthène étaient ensemencés puis incubés à 24°C avec une agitation de 100 rpm. Les cultures étaient transférées (10%) dans du milieu frais aux deux semaines.

Pour la conservation à long terme, les souches et isolats bactériens étaient congelés à -80°C dans des vials en polypropylène de 1,5 ml (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). La procédure consistait à resuspendre les bactéries cultivées pendant 24h à 29°C sur des géloses TSA dans du TSB contenant 20% (v/v) de glycérol stérile et ajouter un ml de suspension par vial.

### **3. IDENTIFICATION DES SOUCHES DÉGRADANT DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

#### **3.1. Souches de la Sablière Thouin**

La caractérisation détaillée s'est limitée aux isolats démontrant une certaine aptitude à dégrader des HAP grâce à la méthode par pulvérisation (voir section 4.2.2). La pureté de chaque isolat a été vérifiée par épuisement sur des géloses TSA et les «nouvelles» souches reconfirmées avec la méthode par pulvérisation.

Le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg et Holt, 1984) ainsi qu'une étude de Molin et Temström (1982) ont servi de références pour le choix des tests et l'interprétation des résultats. La première étape consistait à déterminer si les souches faisaient partie du sous-groupe des pseudomonades fluorescentes. Pour ce faire, la production de pyoverdine a été favorisée par la croissance sur une gélose spécialement conçue ne contenant pas de fer ajouté, le milieu B de King et al. (1954). La composition du milieu B est la suivante (g/l): 1,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 20, Protéose-peptone; 10, glycérol; 15, agar; pH 7,2. Puisque la pyoverdine est un sidérophore fluorescent, elle fut détectée par l'observation de la croissance sous une lampe UV portable (366 nm).

L'apparition ponctuelle d'une coloration bleu-verte diffusible lors de la culture des souches sur géloses TSA suggérait la production de pyocyanine, un pigment caractéristique de *Ps. aeruginosa*. Afin de confirmer cette hypothèse, certaines des souches ont été cultivées sur des géloses Pseudomonas Isolation (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD), dont la composition s'inspire du milieu A de King et al. (1954), lequel est conçu pour promouvoir la production de pyocyanine. La nature du pigment fut confirmée par la conversion du bleu en rosé lors de l'ajout d'une goutte d'HCl 1N sur la gélose (Ajello et Hoadley, 1976).

Contrairement aux autres pseudomonades fluorescentes, *Ps. aeruginosa* peut croître à 42°C et non à 5°C. La capacité d'utiliser le tréhalose, le sorbitol, l'acétamide ou le salicylate fut vérifiée en culture liquide dans le milieu de sels minéraux suivant (g/l): 0,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,04, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,75 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,025 CaCl<sub>2</sub>; 0,2 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,1 NaCl; pH 6,8 (Owens et Keddie, 1969). Le test était effectué dans des tubes 13x100 mm autoclavés avec le milieu de sels minéraux, et le substrat était ensuite ajouté après filtration à 0,22 µm (Millipore Corporation, Bedford, Mass.). La croissance sur le géraniol fut vérifiée par l'ensemencement et l'incubation pendant dix jours de géloses BH dans un bécher de 1000 ml hermétiquement scellé contenant un ml de géraniol. La liquéfaction de la gélatine a été effectuée comme test supplémentaire pour confirmer l'identité d'un *Ps. putida*.

### **3.2. Souches BDP**

En plus des observations morphologiques, certains des isolats BDP cultivés sur géloses TSA ont été ensemencés sur des géloses sélectives et différentielles Pseudomonas Isolation et MacConkey. Quelques souches pures furent également analysées avec des galeries API 20 E (bioMérieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo).

## **4. CRIBLAGE DES ISOLATS BACTÉRIENS POUR LEUR CAPACITÉ À DÉGRADER LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

Le principe général de notre approche a consisté en l'étude de la capacité à dégrader des HAP avant de déterminer le potentiel à produire des biosurfactants.

### **4.1. Étude préliminaire en milieu liquide**

Des tubes contenant sept ml de BH avec 0,01% d'extrait de levure et 0,3% de naphthalène, acénaphthylène, fluorène, phénanthrène ou pyrène, plus un témoin sans HAP, ont été inoculés avec quelques souches et isolats Thouin puis incubés à l'obscurité à la température de la pièce pendant cinq mois.

### **4.2. Criblage sur milieu solide**

#### **4.2.1. Par volatilisation du substrat**

Une gélose TSA et six géloses BH furent ensemencées avec 50  $\mu$ l de suspensions bactériennes, puis placées à l'envers et sans couvercle dans un Pétri de verre hermétiquement scellé avec de la paraffine et du papier aluminium. Le Pétri contenait quelques cristaux d'un des

HAP suivants: naphthalène, acénaphthylène, fluorène, phénanthrène ou pyrène. Une gélose BH et une gélose TSA sans HAP servaient de témoins.

#### 4.2.2. Méthode par pulvérisation des HAP

Cette technique fut originalement décrite par Sylvestre (1981) pour détecter des bactéries utilisant le *p*-chlorobiphényle, Kiyohara et al. (1982) l'ont employée pour les HAP.

La procédure consiste à inoculer les bactéries, prélevées sur des TSA, sous la forme de petits amas de cellules (environ 2 mm x 2 mm) sur des géloses BH ou BHY. L'addition d'extrait de levure pourrait permettre de différencier entre l'utilisation des HAP ou le co-métabolisme. Les géloses sont incubées pendant la nuit (environ 15 heures) à 22°C, puis leur surface est recouverte d'une mince couche de HAP. Les géloses sont ensuite incubées à l'obscurité (pour éviter la photo-oxydation des hydrocarbures) dans des sacs en plastique (pour prévenir le dessèchement).

La pulvérisation sur la gélose de l'hydrocarbure solubilisé dans un solvant organique s'effectue sous une hotte chimique. Tous les HAP étaient solubilisés dans l'acétone à une concentration de 2%, sauf l'anthracène à 2% dans le dichlorométhane, le benz[a]anthracène à 1% dans l'acétone et le benzo[a]pyrène à 1% dans le dichlorométhane.

Une bactérie dégradant un HAP formera une zone d'éclaircissement dans le film opaque entourant la colonie et/ou une coloration dans la gélose.

Au début, afin de vérifier l'innocuité du solvant sur les bactéries, deux tests ont été effectués: la pulvérisation précédant et suivant l'inoculation de la gélose, ainsi que la pulvérisation du solvant seul. Puisque l'acétone n'a pas semblé défavorable à la survie des bactéries, les pulvérisations ont toujours été effectuées après l'ensemencement des géloses.

Toutes les souches Thouin ont été analysées par cette méthode. Toutefois, afin de diminuer la très lourde charge de travail qu'un tel criblage aurait imposé, l'utilisation du naphthalène servit de sélection préliminaire dans certains cas, c.-à-d. qu'en général seules les souches formant une zone avec le naphthalène ont été testées avec les autres HAP. Dans la littérature, le naphthalène

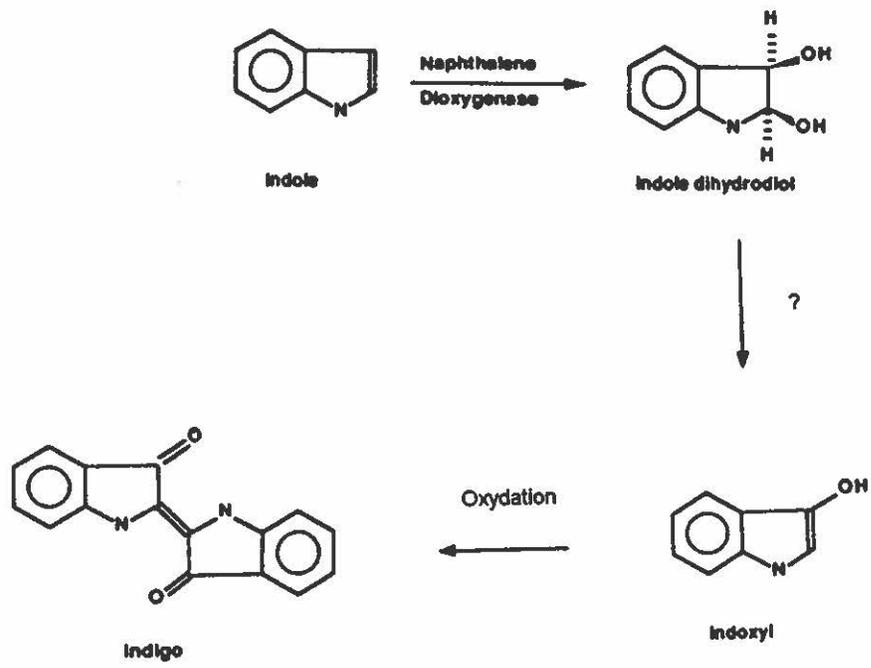
n'est généralement pas testé par pulvérisation car il se volatilise trop rapidement (e.g. Kiyohara et al., 1982). Afin de pouvoir l'employer, la gélose était recouverte de naphthalène une première fois avec une couche relativement épaisse. Après 24 heures d'incubation, une seconde pulvérisation était effectuée pour reconstituer le film volatilisé.

#### 4.2.3. Détection de la naphthalène dioxygénase

Lorsque Ensley et al. (1983) ont cloné des gènes codant pour l'oxydation du naphthalène dans *Escherichia coli*, les colonies sont devenues bleu foncé. Ils ont découvert que l'indole synthétisé par la tryptophanase se transformait en indigo par l'action de la naphthalène dioxygénase. La transformation de l'indole en indigo est une propriété des dioxygénases bactériennes responsables de la formation de *cis*-dihydrodiols (Figure 13). Cette observation permet donc la détection de clones portant les gènes codant pour la naphthalène dioxygénase (Denome et al., 1993; Kiyohara et al., 1994).

Lors de la préparation des géloses BHY, l'agar refroidi reçoit l'indole (concentration finale 1 mM) d'une solution (200 mM) dans l'éther diéthylique avant d'être coulée dans les boîtes de Pétri. Les géloses sont ensuiteensemencées, recouvertes d'une mince couche de naphthalène pulvérisé puis incubées à 22°C. Lors de variations de ce test, l'indole fut essayé à plusieurs concentrations, ainsi que pulvérisé plutôt qu'ajouté directement dans la gélose. L'analyse de la majorité des isolats et souches de Thouin et BDP fut effectuée.

**FIGURE 13.** Transformation de l'indole en indigo par l'action de la naphthalène dioxygénase (Murdoch et al., 1993). Ce test permet de visualiser rapidement la présence d'une activité de la naphthalène dioxygénase.



## **5. CONFIRMATION DE LA BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

### **5.1. Test sur géloses**

#### **5.1.1. Recherche de métabolites de la dégradation**

Quelques tests ont été effectués afin d'étudier les zones d'éclaircissement obtenues avec la méthode par pulvérisation [mise au point de la méthode en collaboration avec Sylvain Milot et Eric Bourdon de l'IAF; une procédure similaire a subséquentement été publiée par Yang *et al.* (1994)]. La gélose sous les zones était prélevée avec un emporte-pièce et déposée dans un vial de 3 ml contenant une goutte d'HCl 1N et un ml d'éther diéthylique. Après une vigoureuse agitation, l'éther était asséché avec un peu de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et analysé avec un chromatographe à phase gazeuse équipé d'un spectromètre de masse (GC-MS). Pour s'assurer d'observer les intermédiaires non-volatils, les échantillons étaient dérivés par triméthylsilylation avec du bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA; Aldrich Chemical, Milwaukee, Wis.). Des pastilles de géloses échantillonnées dans la portion extérieure des halos servaient de témoins.

#### **5.1.2. Étude de l'induction des gènes responsables de la dégradation du naphthalène**

Le premier essai effectué a consisté à pulvériser du naphthalène, phénanthrène ou biphényle sur deux séries de géloses BHYensemencées avec des souches Thouin dégradant les HAP (HAP+), puis à les incubé pendant 24h. Une des séries contenait 50 ppm de salicylate de sodium (Ogunseitan et Olson, 1993). La vitesse de formation et le diamètre des zones d'éclaircissement ont été comparés.

Plusieurs souches Thouin HAP+ ont été analysées avec différents HAP (naphthalène, acénaphthylène, fluorène, phénanthrène et anthracène) sur des géloses BHY avec ou sans salicylate (50 ppm).

Plusieurs autres tests sur géloses BHY ont été effectués. Lors d'un premier essai, les géloses préparées consistaient en un témoin sans additif, une avec 50 ppm de salicylate, une avec 200 ppm de salicylate (concentration inhibitrice d'après Ogunseitan et Olson, 1993), une avec 70 ppm de naphthalène et une avec 70 ppm d'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque (1H2N). Le 1H2N est l'intermédiaire de la dégradation du phénanthrène correspondant à l'acide salicylique (Figure 4). La formation de zones et de pigments a été comparée avec les hydrocarbures aromatiques suivants: naphthalène, biphényle, fluorène, acénaphthylène et phénanthrène. Les géloses ont été incubées pendant 16h à 29°C avant de recevoir les hydrocarbures.

La concentration optimale de salicylate de sodium a également été déterminée par la préparation de géloses BHY contenant des concentrations entre 0 et 500 ppm.

## **5.2. Tests en cultures liquides**

### **5.2.1. Procédure**

Plusieurs expériences ont été effectuées afin d'établir et d'étudier le potentiel de quelques-unes des souches bactériennes à dégrader des HAP.

En général, la procédure consistait à cultiver les bactéries dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml contenant 25 ml du milieu de sels minéraux Bushnell-Haas (BH) stérile. Toutes les expériences ont été effectuées à l'aide de cultures pures. Les HAP étaient ajoutés à partir des solutions-stock préparées pour les tests de pulvérisations sur géloses. On laissait ensuite évaporer le solvant organique sous une hotte chimique avant l'ensemencement. Un témoin abiotique non ensemencé était toujours préparé en même temps. L'incubation des flacons s'effectuait avec une agitation rotative (100 à 200 rpm), dans l'obscurité.

La détermination initiale de l'utilisation des HAP se faisait par l'évaluation de la croissance microbienne (accroissement de la turbidité), l'apparition de colorations dans le milieu de culture et la disparition des cristaux et des émanations d'hydrocarbures. L'augmentation de l'absorbance des

cultures était mesurée avec un spectrophotomètre (Spectronic 101plus, Milton-Roy, Rochester, NY).

### **5.2.2. Extraction et dosage chimique par chromatographie en phase gazeuse**

Afin de pouvoir suivre et quantifier la disparition des HAP, les quantités résiduelles étaient dosées par GC-FID. Pour chacune des déterminations, le contenu complet d'un flacon (25 ml de culture) était acidifié ou alcalinisé (1 ml d'HCl ou NaOH 1N) et transvidé dans un tube de 50 ml en Pyrex. Ce dernier était fermé avec un bouchon vissé comportant un septum recouvert de PTFE. Le milieu était acidifié quand les intermédiaires de la dégradation allaient être étudiés et alcalinisé quand du (bio-)surfactant pouvait interférer avec l'extraction en formant des émulsions. Le contenu était ensuite extrait avec 3 volumes de 10 ml d'éther diéthylique. Un premier 10 ml d'éther servait à rincer le flacon. Le deuxième 10 ml contenait les étalons internes. Si une émulsion se formait et que la phase organique se séparait difficilement de la phase aqueuse, les tubes étaient congelés et décongelés entre chaque ajout d'éther afin de briser l'émulsion. La quantité d'éther d'extraction était finalement ajustée à 25 ml et séchée avec du sulfate de sodium anhydre.

Les HAP furent séparés en injectant un échantillon de 0,1 ml dans un chromatographe en phase gazeuse (GC) modèle 5890A (Hewlett-Packard). Le GC était composé d'une colonne capillaire de type DB5 et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). Le gaz porteur était l'azote (débit de 2 ml/min.). Le programme de température de la colonne était: 70°C augmentant à 290°C à un taux de 20°C/min, puis à 310°C à un taux de 10°C/min et maintenu à cette température pour 7,5 min.

La concentration des HAP résiduels était calculée par comparaison avec un étalon interne ajouté durant l'extraction à une concentration de 100 ppm. Deux étalons étaient inclus dans tous les échantillons: le 9-méthylanthracène et le biphényle.

### **5.2.3. Optimisation de la biodégradation**

Une variété de suppléments et de conditions de culture ont été essayées afin de favoriser la dégradation des HAP. Des cultures ont été effectuées avec l'addition des surfactants Tween 80 (200 ppm) ou Brij 35 (2 mM). Différentes combinaisons de suppléments ont également été ajoutées comme l'inducteur salicylate de sodium, le protéose-peptone, l'extrait de levure, le mannitol, le mélange de HAP facilement dégradables avec d'autres plus récalcitrants, etc.

## **6. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS OU BIOÉMULSIFIANTS**

Plusieurs techniques pouvaient être utilisées pour détecter et mesurer la production de biosurfactants ou bioémulsifiants. Ces méthodes sont basées sur les propriétés soit chimiques, soit physiques des substances émulsifiantes et/ou tensioactives potentiellement produites.

### **6.1. Méthodes indirectes (activité des biosurfactants)**

L'emploi de ces méthodes permet le suivi de la production de biosurfactants sous formes d'analyses ponctuelles pendant les cultures.

#### **6.1.1. «Drop Collapsing Test»**

Premièrement, le «Drop Collapsing Test» (DCT) de Jain *et al.* (1991), modifié pour le rendre plus sensible, permet de déterminer rapidement la production de biosurfactants par la diminution de la tension de surface du milieu de culture. Cette technique consiste à recouvrir d'un mince film d'huile à chauffage un couvercle de microplaquette en polystyrène et à y déposer 150  $\mu$ l de surmageant ou de filtrat à tester dans un des puits ou alvéole. La présence de biosurfactants provoque la diminution de la tension superficielle et ainsi l'étalement de la goutte.

La sensibilité de ce test a été évaluée. Du sumageant de culture contenant une quantité de biosurfactants supérieure à la CMC a été dilué dans de l'eau distillée, et les résultats de la tension superficielle ont été comparés à ceux du DCT.

### **6.1.2. Tensiométrie**

Un tensiomètre manuel (modèle 21, Fisher Scientific, Toronto, Ont.) a été employé afin d'obtenir des valeurs précises de tension superficielle (en mN/m). Cet appareil, utilisant la méthode par anneau de duNuoy, permet de mesurer la force nécessaire pour arracher un anneau de platine-iridium de la surface d'un échantillon de liquide à analyser.

### **6.1.3. Formation et stabilité d'émulsions en tubes**

Un test d'émulsion fut aussi employé. Il est basé sur une caractéristique commune aux surfactants et émulsifiants: la capacité à former et stabiliser un mélange de deux phases liquides immiscibles. La littérature contient de nombreuses techniques et variations permettant de mesurer l'activité émulsionnante de substances plus ou moins purifiées (Bertrand *et al.*, 1994). Pour des analyses ponctuelles, la méthode généralement employée consistait à introduire dans un tube à essai en borosilicate 4,0 ml d'eau distillée, 0,5 ml de la solution à vérifier et 0,5 ml d'huile à chauffage ou d'hexadécane. Un vortexage à l'intensité maximale pendant un temps précis (dix secondes) provoque une émulsion. Après un repos d'une durée déterminée (une minute), la turbidité de l'émulsion est déterminée visuellement (ou par densité optique à 450 nm). Afin de déterminer si l'activité émulsionnante provenait bien des biosurfactants, les échantillons de 0,5 ml ont été extraits avec de l'éther diéthylique et resuspendus dans du bicarbonate de sodium 0,05 M.

## **6.2. Méthodes directes (présence de biosurfactants)**

L'identification des souches utilisant des HAP avait permis d'anticiper quels types de biosurfactants elles pourraient produire et ainsi de choisir des méthodes d'analyse adaptées.

### **6.2.1. Géloses bleues Siegmund-Wagner (SW)**

Siegmund et Wagner (1991) ont développé une nouvelle gélose spécifiquement conçue pour détecter la production de glycolipides anioniques extracellulaires par des micro-organismes, et plus spécialement les rhamnolipides de *Pseudomonas*. Le principe de ce test semi-quantitatif est basé sur la formation d'une paire ionique insoluble entre un surfactant synthétique cationique inclu dans la gélose et le biosurfactant anionique sécrété par les bactéries. Les paires ioniques précipitent, entraînant avec elles des molécules de bleu de méthylène, et une auréole bleu foncé se forme autour des colonies productrices. Leur diamètre est proportionnel à la quantité de biosurfactants produite. Ces géloses se composent du milieu de sels minéraux SW additionné de (g/l): 0,2, bromure d'hexadécyltriméthylammonium (Sigma Chemicals Co., St-Louis, Mo); 0,005, bleu de méthylène; 20, substrat; 15, agar; pH 6,7.

### **6.2.2. Dosage des rhamnolipides**

La revue de la littérature ainsi que les résultats déjà obtenus indiquent que les biosurfactants produits par *Ps. aeruginosa* sont constitués d'une mixture de rhamnolipides (Jarvis et Johnson, 1949; Burger et al., 1963; Edwards et Hayashi, 1965; Itoh et al., 1971; Syldatk et al., 1985). L'approche habituellement employée pour évaluer la concentration de rhamnolipides dans un milieu de culture consiste en la quantification de la portion du L-rhamnose.

Une méthode conçue originalement pour la détection des pentoses a été utilisée (Chandrasekaran et BeMiller, 1980). Certaines modifications inspirées de celles rapportées par Koch et al. (1991), ont été apportées. La procédure consistait à: [1] extraire trois fois avec un ml d'éther diéthylique 300  $\mu$ l de sumageant de culture acidifié avec une goutte de HCl 2N, le

surmageant étant obtenu par centrifugation d'un ml de culture à 13k rpm pendant une minute, [2] recombinaison et évaporer les fractions organiques et resuspendre dans 0,5 ml de bicarbonate de sodium 0,05 M (Itoh et al., 1971), parfois plus si la concentration de rhamnolipides dépassait la capacité de la méthode, [3] à 200 µl de chaque échantillon, ajouter 1,8 ml d'une solution d'acide sulfurique à 53% contenant 0,2% d'orcinol (J.T. Baker Chemicals, Philipsburg, N.J.), [4] chauffer les tubes dans l'eau bouillante pendant 20 min. et les refroidir à la température de la pièce durant 15 min. et [5] mesurer l'absorbance à 421 nm dans des cuvettes en verre, puis calculer la concentration de rhamnose à partir d'une courbe étalon préparée avec du rhamnose.

### **6.3. Production de biosurfactants avec substrats solubles**

La procédure générale consistait à ensemencer avec une bouclée d'une culture de 24-48 heures sur TSA un flacon contenant le milieu de sels minéraux et un substrat (dextrose, mannitol ou glycérol) à une concentration de 2%. La culture était ensuite incubée pendant 5 à 10 jours à 22°C à une agitation de 150-200 rpm. La croissance bactérienne était évaluée en mesurant l'absorbance à 600 nm. La production de biosurfactants était déterminée par la formation de mousse, l'apparition d'une activité émulsifiante et la diminution de la tension superficielle du milieu de culture. Alors que le mannitol et le glycérol étaient ajoutés dans le milieu de culture avant la stérilisation par autoclavage, le dextrose (solution-stock à 20% par filtration 0,22 µm) était introduit après la stérilisation. La production de biosurfactants en cultures liquides a été confirmée par l'ensemencement de géloses bleues SW.

#### **6.3.1. Essai avec sucrose pour souches négatives**

Un milieu de culture différent ayant servi à la production de biosurfactants par une souche de *Ps. fluorescens* a été essayé (Persson et Molin, 1987). Il se composait de (g/l): 6,6, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,0, NH<sub>4</sub>Cl; 0,2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,5, NaCl; 0,5, extrait de levure; 50, sucrose.

### **6.3.2. Extraction des biosurfactants**

Le surnageant de la culture est obtenu par centrifugation à 10k x g durant 10 min. (bouteilles JA-10; centrifugeuse J-21C, Beckman Instruments, Palo Alto, Ca.). Le pH est ensuite abaissé à 2,0 avec du HCl 2N puis les glycolipides extraient avec de l'éther diéthylique dans un ballon à décantation, jusqu'à ce que le test DCT de la phase aqueuse devienne négatif. Le culot cellulaire peut également être resuspendu, centrifugé et extrait tel que décrit précédemment. La plus grande partie de l'éther est volatilisé. La solution concentrée de rhamnolipides partiellement purifiés était conservée dans un tube hermétique à 4°C.

## **6.4. Production de biosurfactants ou bioémulsifiants à partir d'un hydrocarbure aromatique polycyclique**

### **6.4.1. Études préliminaires**

Les premiers essais ont été effectués dans le milieu de sels minéraux SW. Le naphthalène ou phénanthrène (1-2%) était finement broyé avec un pilon et un mortier avant d'être ajouté au milieu de culture. Les cellules de l'inoculum étaient cultivées sur des géloses BHY recouvertes de naphthalène.

### **6.4.2. Cinétique de la production de rhamnolipides à partir du naphthalène**

Les cultures étaient effectuées dans des flacons contenant le milieu SWF et 2% de naphthalène. L'inoculum provenait de pré-cultures dans les mêmes conditions et était constitué soit d'une portion aliquote de la culture, soit des cellules lavées dans le SWF. Les flacons étaient incubés à 25-30°C, avec une agitation à 200 rpm. Des échantillons de culture étaient régulièrement prélevés et conservés à 4°C avant d'être analysés.

#### 6.4.2.1. Estimation de la quantité d'intermédiaires de la dégradation du naphthalène

Box (1983) a décrit une méthode permettant d'évaluer la concentration de substances aromatiques hydroxylées dans l'eau. Des chercheurs l'ont donc utilisée pour estimer la quantité d'intermédiaires métaboliques s'accumulant lors de la biodégradation de HAP (Guerin et Jones, 1988a; Kiyohara *et al.*, 1994). Cette procédure a été adaptée comme suit: [1] 150 µl d'une solution de carbonate de sodium (200 g/l) et 50 µl de réactif Folin-Ciocalteu (BDH, Toronto, Ont.) sont ajoutés à 1 ml d'échantillon à analyser (surnageant ou filtrat de culture), [2] les tubes sont ensuite laissés pendant 60 min à 22°C, [3] puis l'absorbance mesurée à 750 nm, [4] la concentration de métabolites polaires est calculée à partir d'une courbe étalon préparée avec du salicylate de sodium, et exprimée en équivalents de salicylate.

#### 6.4.2.2. Evaluation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire

Le «Microbial Adhesion To Hydrocarbons (MATH) assay» décrit par Rosenberg (1991) a été modifié, et certains changements étaient inspirés de Zhang et Miller (1994). La procédure consistait à: [1] laver deux fois les cellules de chaque échantillon pour éliminer les biosurfactants, [2] resuspendre les cellules dans une solution de 0,85% NaCl à une densité optique d'environ 0,75 à 400 nm, [3] vortexer 2 ml de suspension cellulaire avec 0,5 ml d'hexadécane dans un tube 16 x 125 mm pendant 30 sec, [4] après 30 min de repos, la diminution de l'absorbance de la phase aqueuse comparativement à celle de la suspension cellulaire initiale est mesurée, [5] l'hydrophobicité est évaluée en calculant le pourcentage de cellules adhérant à l'hexadécane par la formule suivante:  $1 - (A_{\text{après}}/A_{\text{avant}}) \times 100 = \% \text{ d'hydrophobicité}$ .

#### 6.4.2.3. Mesure de la solubilité apparente du naphthalène dans le milieu de culture

La procédure a été adaptée de la méthode utilisée par Hunt *et al.* (1994). Pour la mise au point, une série de cinq flacons de 50 ml contenant 10 ml de bicarbonate de sodium 0,05 M et 200 ppm de phénanthrène ont reçu 0, 0,25, 0,5, 0,75 et 1,0 ml respectivement d'une solution de

rhamnolipides dans l'éther diéthylique (environ 51 mg/ml, déterminé par gravimétrie). Ces rhamnolipides avaient été produits par la souche 34 croissant sur le naphthalène et extraits par la procédure décrite plus haut. Les flacons ont ensuite été agités à 100 rpm et 30°C pendant deux jours. Sept ml de chaque suspension furent ensuite centrifugés (Labofuge A, Canlab) à 500 x g durant 30 min. La concentration de phénanthrène dans 5 ml de surnageant a finalement été déterminée dans chacune des suspensions par la procédure habituelle, après acidification avec HCl 2N.

Pour l'analyse des échantillons de culture sur le naphthalène, une portion aliquote de 1,3 ml était centrifugée dans un vial en polypropylène de 1,5 ml. La quantité de naphthalène par ml de surnageant était déterminée.

## RÉSULTATS

## **1. MICRO-ORGANISMES**

### **1.1. Liste des isolats bactériens de la Sablière Thouin**

Une grande variété d'hydrocarbures contamine la Sablière Thouin (Tableau 5). Une microbiothèque regroupant les principales bactéries isolées des bioréacteurs contenant ce sol a été constituée au cours des travaux d'optimisation (Tableau 6) (Paquette et al., 1993b). Ces 84 bactéries partiellement identifiées ont été criblées pour leur capacité à dégrader des HAP. L'identification préliminaire des isolats suggère la prédominance des *Pseudomonaceae* dans le sol contaminé de Thouin (Paquette et al., 1993a).

### **1.2. Isolats BDP**

Afin d'étudier l'hypothèse d'un lien entre la capacité à dégrader des HAP récalcitrants et la production de biosurfactants, des micro-organismes ont été isolés d'un sol fortement contaminé prélevé à la base de poteaux de bois traités. L'agent de préservation se composerait en grande partie de créosote, une fraction obtenue de la distillation du pétrole brut, constituée d'environ 85% de HAP (Mueller et al., 1989b). Le décompte approximatif donnait environ  $1 \times 10^7$  ou  $1 \times 10^8$  unités formatrices de colonies (UFC) par ml de boue. Après 24 heures d'incubation, au moins 90% des UFC formaient une zone claire et un pigment brun-orangé dans le phénanthrène pulvérisé sur des géloses BHY. Plusieurs colonies produisaient le pigment jaune caractéristique sur des géloses BHY recouvertes de fluorène. Onze de ces dernières ont été choisies car elles formaient également une zone d'éclaircissement. Elles ont été désignées isolats 100 à 110. Quarante-huit heures après la vaporisation, une pigmentation orangée brillante apparut autour des colonies sur les géloses BHYS recouvertes de fluoranthène, un peu aussi sur les BHY. Trois jours plus tard, les isolats 90 à 99 furent ainsi sélectionnés par leur capacité à former une zone d'éclaircissement et/ou une coloration orangée avec le fluoranthène. La conservation de ces isolats était effectuée

en cultures liquides contenant des HAP afin d'éviter une perte possible d'activité catabolique et parce que certains croissaient trop lentement sur milieu solide.

## **2. DÉGRADATION DES HAP: CRIBLAGE DES ISOLATS BACTÉRIENS**

Les isolats ont été analysés pour leur potentiel à utiliser des HAP comme substrat avant de vérifier s'ils pouvaient produire des biosurfactants, tel que formulé dans l'hypothèse de travail initiale.

### **2.1. Essai préliminaire**

Une expérience a été effectuée afin d'obtenir quelques indices sur l'aptitude de certains des isolats Thouin à croître sur des HAP. Les souches et isolats Thouin 6, 18, 19, 19S, 19R, 32-2, 34, 38, 50, 57, 59-2 et 78-2 ont été cultivés en milieu liquide avec différents HAP. Après cinq mois d'incubation, une croissance visuellement significative (comparaison avec le témoin) et un pigment beige (rougeâtre à brun) étaient observables dans tous les tubes avec naphthalène, sauf pour les isolats 6 et 34. Toutes les cultures avec phénanthrène étaient rose-orangées (intensité variable), sauf cellesensemencées avec les isolats 6, 34 et 50. Aucune différence notable fut observée avec les autres HAP testés. L'apparition de pigment lors de la biodégradation de HAP suggère que le substrat aromatique a été transformé, ou au moins partiellement dégradé. De tels changements de couleurs sont souvent associés à l'accumulation de produits du clivage en position méta de cycles aromatiques (Mueller et al., 1989a).

**Tableau 5.** Contaminants détectés dans la Sablière Thouin. Les méthodes standardisées de l'Environmental Protection Agency (EPA 624 et EPA 625) ont été utilisées.

Composés détectés	Concent. (µg/g)	Limite de détection (µg/g)	Composés détectés	Concent. (µg/g)	Limite de détection (µg/g)
1,1-dichloroéthylène	51	2	naphtalène	6100	100
dichlorométhane	20	20	acénaphthylène	1200	100
chloroforme	3	2	acénaphthène	300	100
1,1,1-trichloroéthane	76	5	fluorène	930	100
benzène	140	2	phénanthrène	2000	100
1,2-dichloroéthane	610	5	anthracène	440	100
trichloroéthylène	350	2	fluoranthène	360	100
toluène	600	5	pyrène	680	100
1,1,2-trichloroéthane	3300	2	benz[a]anthracène	170	100
tétrachloroéthylène	95	2	chrysène	180	100
chlorobenzène	21	2	bis(2-éthylhexyl)phthalate	TR	100
éthylbenzène	620	2	benzo[b+k]fluoranthène	107	100
<i>m+p</i> -xylène	440	5	benzo[a]pyrène	120	100
<i>o</i> -xylène	190	2	phénol	0,19	0,1
styrène	550	5	2,4-diméthylphénol	TR	0,6
mésitylène	48	2	2,4,6-trichlorophénol	TR	0,1
<i>a</i> -méthylstyrène	110	2	<i>o</i> -crésol	0,15	0,1
1,2-dichlorobenzène	20	2	<i>m+p</i> -crésol	0,26	0,1

TR:traces.

**TABLEAU 6.** Bactéries isolées des réacteurs contenant des échantillons de sol de la Sablière Thouin contaminé par des hydrocarbures (Paquette *et al.*, 1993a et b). Ces réacteurs avaient été conçus pour l'étude de la décontamination de la Sablière.

#	##	Identification préliminaire	Origine	#	##	Identification préliminaire	Origine
1	1	<i>Alcaligenes</i> sp.	R2T7	43		<i>Bacillus</i> sp.	R5T182
2		<i>Moraxella</i> sp.	R3T7	44	44	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R6T182
3		<i>Pseudomonas fluorescens</i>		45		<i>Staphylococcus</i>	R12T70
4	4	<i>Pseudomonas</i> sp.		46-1	46	groupe <i>Ps. fluorescens</i>	R11T70
5	5	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		47-2	47	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R13T70
6		<i>Streptococcus</i> sp.	R2T7	48-2	48	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R14T70
	6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		49-1		<i>Bacillus</i> sp.	R10T70
7		<i>Streptococcus</i> sp.	R2T7	49-2		<i>Bacillus</i> sp.	R10T70
	7	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		50		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R15T67
8		<i>Alcaligenes</i> sp.	R3T7	54-1		<i>Pseudomonas maltophila</i>	R2T210
9		<i>Pseudomonas maltophila</i>	R2T7	55	55	<i>Pseudomonas</i> sp.	R3T210
10	10	<i>Pseudomonas maltophila</i>	R2T7	56	56	<i>Pseudomonas</i> sp.	R5T196
11	11	<i>Achromobacter</i> sp.		57	57	<i>Pseudomonas</i> sp.	R6T196
12		<i>Pseudomonas maltophila</i>	R3T7	58-1		<i>Pseudomonas</i> sp.	R10T84
13	13	<i>Pseudomonas</i> sp.	R2T7	58-2	58	groupe <i>Ps. fluorescens</i>	R10T84
14	14	<i>Bacillus</i> sp.	R10T28	59-1		<i>Pseudomonas</i> sp.	R12T84
15		<i>Bacillus</i> sp.	R12T28	59-2	59	<i>Pseudomonas</i> sp.	R12T84
16	16	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R6T154	60		<i>Pseudomonas</i> sp.	R11T84
17		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R6T154	61		<i>Pseudomonas</i> sp.	R13T84
18		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R6T154	62		<i>Pseudomonas</i> sp.	R14T84
	18	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R18T39	63		<i>Pseudomonas</i> sp.	R15T84
19	19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R6T154	64		<i>Pseudomonas</i> sp.	R16T81
20	20	<i>Enterobacter cloacae</i>	R14T28	65-1		<i>Pseudomonas</i> sp.	R18T81
21	21	<i>Serratia liquefaciens</i>	R11T28	65-2		<i>Pseudomonas</i> sp.	R18T81
22	22	<i>Pseudomonas putida</i>	R14T28	66		<i>Pseudomonas</i> sp.	R19T28
23		<i>Klebsiella oxycota</i>	R13T28	67		<i>Pseudomonas</i> sp.	R2T224
24	24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R5T154	68		<i>Pseudomonas</i> sp.	R3T224
25	25	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R5T154	69		<i>Pseudomonas</i> sp.	R5T210
26		<i>Streptococcus</i>	R2T7	70		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R6T210
	26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R15T38	71		groupe <i>Ps. fluorescens</i>	R11T98
28-1		<i>Pseudomonas putida</i>	R11T56	72		groupe <i>Ps. fluorescens</i>	R13T98
28-2	28	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R11T56	73		groupe <i>Ps. fluorescens</i>	R14T98
	29	<i>Achromobacter</i>		76-1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R15T95
32-1	27	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R14T56	77-1	77	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R16T95
32-2	32	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R14T56	77-2		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R16T95
34	34	<i>Chromobacterium</i>	R15T53	78-1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R18T95
38	38	<i>Pseudomonas putida</i>	R18T53	78-2	78	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R18T95
40		<i>Pseudomonas maltophila</i>	R2T196	79-1		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R19T42
42	42	<i>Chromobacterium</i>	R3T196	79-2		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	R19T42

# et ##: les isolats pouvaient appartenir à deux séries de numéros différentes.

Réacteurs: ex. R2T196 signifie que l'isolat provient d'un échantillonnage effectué dans le réacteur #2 après 196 jours d'incubation.

## **2.2. Criblage sur milieu solide**

La technique de pulvérisation des HAP sur les géloses est couramment utilisée et généralement reconnue comme une bonne indication de la capacité à dégrader les HAP (e.g. Grosser *et al.*, 1991; Kästner *et al.*, 1994).

Un test a été effectué afin de vérifier si les isolats Thouin 19, 47, 77-1 et 78-2 pourraient croître à partir seulement de vapeurs de certains HAP. La seule croissance significative obtenue sur des géloses BH fut celle des isolats 19 et 78-2 avec le naphthalène, car ce dernier est suffisamment volatil.

### **2.2.1. Souches de la Sablière Thouin**

Trois critères ont motivé le choix des HAP testés avec la méthode par pulvérisation: [1] leur présence dans la Sablière Thouin, [2] leur importance en tant que polluants, et [3] la formation d'un film opaque sur la gélose. Ce dernier point explique pourquoi l'interprétation des pulvérisations avec l'anthracène se révélait parfois difficile et que le chrysène ne fut pas testé. L'addition d'une faible concentration d'extrait de levure dans les géloses (BHY) avait comme but d'encourager ou d'aider les bactéries à s'acclimater aux conditions de culture en fournissant des éléments nutritifs essentiels.

Parmi les 84 isolats et souches de la Sablière Thouin testés avec la méthode par pulvérisation, 34 ont produit au moins une zone d'éclaircissement ou un pigment, indiquant la dégradation d'un HAP (Tableau 7).

Les isolats numérotés seulement dans la première série (#) ont subi une analyse préliminaire avec le naphthalène, alors que ceux de la deuxième série (##) ont aussi été testés avec l'acénaphthylène, le fluorène et le phénanthrène même si le naphthalène était négatif.

Lors de l'analyse avec le naphthalène, les zones réapparaissaient rapidement en quelques dizaines de minutes après la seconde pulvérisation. Si du naphthalène était repulvérisé, on

observait alors une croissance bactérienne significative, ainsi que l'apparition toujours plus rapide de zones de plus en plus grandes.

Les souches de référence productrices de biosurfactants *Ps. aeruginosa* UG2 et PG201 ont aussi été étudiées avec la méthode par pulvérisation sur des géloses BHY, avec le naphthalène, l'acénaphthylène, le fluorène et le phénanthrène. Aucune zone d'éclaircissement ou pigmentation n'a été observée.

Un autre test a été effectué afin de vérifier si les souches Thouin pouvaient former des zones d'éclaircissement avec le pyrène ou le benz[a]anthracène. Des géloses TSA ont étéensemencées avec les souches HAP+ puis recouvertes d'une mince couche de naphthalène afin d'induire les gènes de la dégradation des HAP. Après volatilisation du naphthalène (16h), le pyrène ou le benz[a]anthracène furent pulvérisés sur les géloses et ces dernières incubées selon la procédure habituelle. Après plus de deux mois d'incubation, aucune zone d'éclaircissement ou formation d'une pigmentation n'a pu être observée.

La méthode par pulvérisation suggère qu'une proportion importante des souches isolées de la Sablière Thouin peuvent dégrader des HAP de deux et trois cycles aromatiques, mais pas de quatre cycles comme le pyrène et le benz[a]anthracène.

### **2.2.2. Analyse des isolats BDP**

Un premier test a été effectué pour étudier le potentiel des isolats BDP. Ceux sélectionnés sur le fluoranthène (90 à 99) ont étéensemencés sur des géloses TSA et BHYS et pulvérisées de fluoranthène. Ceux isolés sur le fluorène (100 à 110) ont été retestés sur TSA et BH avec le fluorène. Les isolats 90 à 99 recouverts de fluoranthène, sauf le 95, ont rapidement (en moins de 3 heures) formé un pigment orangé sur BHYS. Trois heures après avoir recouvert les isolats 100-110 de fluorène, le pigment jaune brillant et une zone d'éclaircissement [indiqué par \*] étaient déjà apparents autour des isolats 103, 104, 105\*, 107\* et 110\*. Les isolats 100, 101, 106 et 108 produisaient moins de pigment jaune, alors que 102 et 109 peu ou pas. Sur géloses BH, les

résultats étaient similaires mais plus faibles; seules les souches 105 et 107 formaient des zones d'éclaircissement.

La seconde analyse a consisté à comparer certains isolats BDP avec des souches Thouin. Des géloses BH ensemencées avec les isolats BDP 91, 99, 105 et 107 et les souches Thouin 19SV, 34, 57 et 59 ont été recouvertes de fluorène ou de phénanthrène. Ce test a permis de confronter leur potentiel à former des zones et/ou des pigments. Une heure après la pulvérisation du fluorène, les souches 105 et 107 étaient entourées d'un intense pigment jaune et une zone était apparue après 3 heures d'incubation. Deux jours plus tard, les souches 105 et 107 avaient formé les zones les plus grandes avec le fluorène et le phénanthrène. Les six autres commençaient à produire un pigment jaune avec fluorène et une zone avec phénanthrène.

L'étude des isolats (souches) 105 et 107 a été poussée plus loin. Elles ont été ensemencées sur des géloses BH, BHY et BHYS, puis recouvertes de fluoranthène. Un pigment orangé est apparu après 24 heures d'incubation. Trois jours plus tard, des zones d'éclaircissement s'étaient formées, celles sur BH étaient les plus petites.

L'analyse préliminaire du spectre des isolats BDP 91, 99, 103, 105, 107, 110, 112 et 113 a été effectuée sur des géloses BHY avec les hydrocarbures suivants: naphthalène, biphenyl, acénaphthylène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benz[a]anthracène, chrysène et benzo[a]pyrène (Tableau 8). Aucune zone n'a pu être observée avec le chrysène et le benzo[a]pyrène.

Une analyse par pulvérisation des HAP sur géloses BHY a également été effectuée sur les différentes souches constituant les isolats BDP (Tableau 9). Tous les HAP ont été analysés et le spectre des souches pures (A, B, C) a été comparé à leurs isolats d'origine (M). Dans plusieurs cas, une des souches formant l'isolat était inactive contre les HAP. Par exemple, pour l'isolat 99M, les deux souches purifiées 99A et B étaient négatives, suggérant qu'une autre souche n'avait pas été isolée ou qu'une combinaison des deux était nécessaire. Le test de conversion de l'indole en indigo a aussi été fait (voir section suivante, 2.2.3.), et plusieurs souches testées ont été négatives malgré une réaction positive à la pulvérisation de HAP. De plus, certaines des souches ne

produisaient pas le pigment généralement observé lors de la transformation des HAP contenant un cycle à cinq carbones.

L'analyse des isolats BDP a démontrée que la plupart sont formées de souches démontrant des capacités de dégradation des HAP distinctes, souvent différentes de celles de la Sablière Thouin. Des signes de biodégradation de HAP de haut poids moléculaire comme le fluoranthène, le pyrène et le benz[a]anthracène indiquent que certaines des souches BDP ( par exemple 100B, 105, 107, 110C) possèdent des capacités métaboliques supérieures à celles généralement décrites dans la littérature.

### **2.2.3. Conversion de l'indole en indigo**

Cette réaction devrait aider à la mise en évidence de l'activité de la naphtalène dioxygénase et permettre le criblage de souches potentiellement intéressantes. Elle pourrait également permettre de savoir si une dioxygénase est induite par d'autres HAP, surtout par les souches ne causant pas de zones. Mais pour cela, il fallait déterminer si la présence de naphtalène provoque une différence notable dans la vitesse d'apparition du bleu indigo. De l'indole fut ajouté aux géloses car les bactéries du genre *Pseudomonas* ne possèdent pas la tryptophanase et donc ne produisent pas naturellement d'indole.

#### **2.2.3.1. Induction de la naphtalène dioxygénase par les HAP**

Deux séries de géloses BHY avec indole furent inoculées avec les souches Thouin HAP+, dont l'une série recouverte de naphtalène pulvérisé pour assurer l'induction des gènes de la dégradation (Tableau 7). Ce test fut toutefois modifié afin de vérifier la possibilité que l'indole lui-même induise la naphtalène dioxygénase. Deux géloses BHY ont été inoculées avec quatre souches (19SJ, 34, 57 et 60), et l'une des géloses était recouverte d'un mince film de naphtalène pulvérisé. Après 24 heures d'incubation, le naphtalène étant volatilisé, une solution d'indole fut pulvérisée sur les deux géloses. L'addition de l'indole après la pulvérisation du naphtalène a

permis d'observer que les colonies induites devenaient bleues plus rapidement. Nos résultats suggèrent cependant que l'indole induit lui-même la naphtalène dioxygénase, ou qu'une certaine activité constitutive de la naphtalène dioxygénase est présente.

Afin de vérifier si un HAP autre que le naphtalène pourrait induire la conversion de l'indole en indigo, quatre souches (19SJ, 19R, 19SV et 57) furent ensemencées sur deux géloses BH, dont une recouverte de phénanthrène. Après deux jours d'incubation à 22°C, les quatre souches ont formé des zones. Une solution d'indole fut alors pulvérisée sur les géloses et la vitesse d'apparition de l'indigo comparée. Il semblerait que les souches induites par le phénanthrène transforment plus rapidement l'indole en indigo que celles sans pulvérisation préalable.

#### 2.2.3.2. Effet de la concentration d'indole

Une expérience fut également effectuée pour étudier l'influence de la concentration d'indole dans la gélose sur l'apparition de l'indigo. Ce test pourrait permettre de vérifier si l'induction de la naphtalène dioxygénase par la pulvérisation du naphtalène est plus facilement détectable à des concentrations d'indole moindres. Deux séries de cinq géloses BHY contenant différentes concentrations d'indole ont été ensemencées avec six souches HAP+, puis du naphtalène fut pulvérisé sur l'une des séries. Le Tableau 10 montre que la présence de naphtalène a induit l'apparition de l'indigo à une plus faible concentration d'indole chez les souches 18G, 19R, 19SJ et 57. Ce résultat suggère qu'une différence dans l'induction de la naphtalène dioxygénase par le naphtalène ne soit apparente que chez les *Ps. aeruginosa* (souches 57, 18G, 19R et 19SJ), et non chez les *Ps. fluorescens* (souches 60 et 61).



**TABLEAU 7.** Étude du spectre catabolique des souches Thouin avec la méthode de pulvérisation des HAP sur milieu gélosé (fin).

#	##	NAP	BiP	ACE	ACN	FLU	DBT	DBF	PHE	ANT	IND
44	44	-		-		-			-		
45		-									
46-1	46	+		-		-			+?		-
47-2	47	-		-		-			-		
48-2	48	+		-		-			+?		-
49-1		-									
49-2		-									
50	50	++j		-?		-?			+?		+
54-1		-									
55	55	-		-		-			-		
56	56	-									
57	57	+++j <sup>b</sup>	+	++B	++	++++	+++o	+j	++++	++	+++
58-2	58	-		-		-			-		
59-2	59	++		++b		++			++	+	+
61-1	61	+		+b		+			+		+
60		+		+b		+			+		+
62		+++		b	+	++	+o	+++j	+++	++	
63		++		b		+			++	+	
64		-									
65-1	65	++		+b		+			++		+
65-2		-									
66		-									
67		+		+b		+			++		+
69		+++		b		+			+++		+
70		-									
71		-									
73		+		b		++			++		+
76-1		++		b		+			++	++	+
77-1		-		-		-			-		
77-2		+++		b		+			++	++	+
78-1		-									
78-2		+++		b		+++			++++	++	+
	78S	+++		?		++			+++	++	+
	78R	++++	+ <sup>b</sup>	b		+++			++++	++	+++
79-1		-									
79-2		+++		b					++	+	

NAP: naphtalène; BiP: biphényle; ACE: acénaphthylène; ACN: acénaphthène; FLU: fluorène; DBT: dibenzothiophène; DBF: dibenzofurane; PHE: phénanthrène; ANT: anthracène; IND: conversion de l'indole en indigo.

#: Isolats ayant subi une analyse préliminaire avec le naphtalène seulement;

##: Isolats testés avec ACE, FLU et PHE même si le NAP était négatif;

+ à ++++: critères combinés de vitesse d'apparition ainsi que diamètre de la zone. Comparaison par rapport au même HAP. ?: résultats équivoques ou variables;

j, pigment jaune hydro-soluble; o, pigment orangé hydro-soluble; b, pigment brun non-soluble;

Toujours pigment jaune brillant diffusible produit lorsque des zones apparaissent dans la fluorène (sauf 6B et J) et le biphényl;

Pour observer une réaction avec ACE, ACN, FLU, DBT ou DBF, un autre substrat doit être présent dans la gélose (BHY);

L'ajout de salicylate induit ou facilite la formation de zones dans ACE et FLU par les souches ne produisant habituellement que le pigment brun ou jaune;

<sup>a</sup>: seulement si 0,05% extrait de levure ajouté au BH (gélouses BHY);

<sup>b</sup>: seulement si salicylate ajouté au BH;

<sup>c</sup>: seulement sur géloses riches (ex. TSA);

**TABLEAU 8.** Résultats du criblage d'isolats BDP avec la méthode par pulvérisation des HAP sur géloses BHY.

Isolats	NAP	BiP	ACE	FLU	PHE	ANT	FLA	BEA	PYR
91	++	+	-	++J	+	+	-	-	B
99	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103	+	+J	B	++J	++	++	+O	-	B
105	++	++J	++B	+++J	++	++	+++O	-	B
107	++	++J	++B	+++J	++	++	+++O	+	B
110	++	+J	B	++J	++	+	++O	-	B
112	+	-	-	-	+	-	-	-	-
113	++	+	+B	+	++	+	-	-	-

B: pigment brun foncé non-diffusible; J: pigment jaune diffusible; O: pigment orangé diffusible;  
 NAP: naphthalène; BiP: biphenyle; ACE: acénaphthylène; FLU: fluorène; PHE: phénanthrène; ANT: anthracène; FLA: fluoranthène; BEA: benz[a]anthracène; PYR: pyrène;

**TABLEAU 9.** Analyse qualitative du profil catabolique des isolats BDP (M), ainsi que de la majorité des souches les constituant (A, B, C). Méthode par pulvérisation des HAP sur géloses BHY (cette méthode permet d'estimer la capacité des bactéries à dégrader les HAP.) et test de conversion de l'indole en indigo (indique une activité de la naphthalène dioxygénase).

Souches	NAP	BiP	ACE	ACN	FLU	DBT	DBF	PHE	ANT	FLA	PYR	BEA	IND
91A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91B	+	++	b	+	+	-	-	++	+	+	b	-	-
91M	+	++	b	+	++	++	+	++	+	+	b	-	+
99A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
99M	++	++	b	++	++	+++	+++	+++	+	-	b	-	+
100A	-	+	b	+	++	++	++	++	+	o	b	-	-
100B	++	++	b	+++	+++	+++	++	++	+++	++	b	+	+++
100M	+	++++	b	-	+++	++	+	++	++	o	b	-	++++
101A	++	+++	b	+++	+++	++	++	++	++	+	b	-	++
101B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101M	++	+++	+	+++	+++	+++	++	++	++	+	b	-	+
103A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
103B	++	-	+	++n	++n	+++	+n	+++	+++	-	-	+	-
103M	+	++++	-	+++	+++	+++	++	++	+++	+	b	+	-
105	++++	++++	b	++++	++++	+++	++++	+++	+++	+++	b	+++	+++
107	++	++++	b	+++	+++	++++	+++	++	++	++	b	++	+++
110A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++
110B	+	-	b	-	++n	+n	+	++	+++	-	-	-	+
110C	+	-	+	-	++n	++	++	++++	+++	+	b	+	+
110M	++	++++	b	+	++	++	+	++	++	+	b	-	++++
112A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112B	+	-	b	-	-	+	-	++	-	-	-	-	-
112C	++	-	b	-	++n	+	+	+++	+	-	-	+	-
112M	+	-	-	-	-	o	-	++	-	-	-	-	-
113A	+	+	b	-	++n	+	j	++	+	-	-	-	-
113B	+	+n	b	+	++n	++	j	++	+	-	-	-	-
113M	+	+	b	+	+n	+	j	++	+	-	-	-	-
114A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
114B	++	++	b	-	+++n	++	+	++	++	+n	-	-	-
114M	+	+	b	-	-	-	j	+	-	-	-	-	-
115A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
115B	-	-	b	-	++n	++n	-	++	+	-	-	-	-
115C	-	-	b	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
115M	-	-	-	-	-	o	-	+	-	-	-	+	++++
116A	++	+++	b	+n	++	++	++	++	++	-	b	-	++
116B	+	++	b	++	+++	++	+++	++	++	+	b	-	++++
116M	+	+++	b	++	++++	++	++	++	++	-	b	-	-

NAP: naphthalène; BiP: biphényle; ACE: acénaphthylène; ACN: acénaphthène; FLU: fluorène; DBT: dibenzothiophène; DBF: dibenzofurane; PHE: phénanthrène; ANT: anthracène; FLA: fluoranthène; BEA: benz[a]anthracène; PYR: pyrène; IND: conversion de l'indole en indigo.

n: absence de pigment habituellement attendu; o: pigment orangé; b: pigment brun foncé; j: pigment jaune; Un pigment jaune brillant diffusible était toujours produit lorsque des zones apparaissent dans la fluorène, le biphényle et le dibenzofurane;

Par exemple, l'isolat 110M a été purifié en ses souches composantes 110A, 110B et 110C.

**TABLEAU 10.** Étude comparative de la sensibilité du test de conversion de l'indole en indigo avec ou sans pulvérisation de naphthalène. Comparaison entre souches *Ps. aeruginosa* (57, 18G, 19R, 19SJ) et *Ps. fluorescens* (60, 61).

Souches	Sans pulvérisation de NAP					Avec pulvérisation de NAP				
	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0
18G	-	-	-	b	b	-	-	b	b	b
19R	-	-	-	b	b	-	-	b	b	b
19SJ	-	-	-	-	b	-	-	-	b	b
57	-	-	-	b	b	-	-	b	b	b
60	-	-	-	b	b	-	-	-	b	b
61	-	-	-	b	b	-	-	-	b	b

b: formation de bleu indigo;

-: négatif;

### 3. IDENTIFICATION DES SOUCHES DÉGRADANT DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

#### 3.1. Souches Thouin

La première étape de l'identification a consisté à purifier les isolats par étalement sur des géloses TSA. L'isolat 6 contenait les formes 6T, 6B et 6J; l'isolat 18 les souches 18G et 18P; l'isolat 19 était constitué de 19R et 19S, cette dernière comprenant les formes 19SV et 19SJ; 32-2 contenait les souches 32-2S et 32-2R, et l'isolat 78-2 était composé des souches 78-2S et 78-2R. Les autres isolats furent considérés comme des souches pures.

L'identification préliminaire indiquait que la plupart des souches appartenaient au groupe des pseudomonades (Tableau 6), mais puisqu'elles proviennent de l'environnement, on ne pouvait confirmer l'espèce par des méthodes d'identification classiques comme les galeries API.

La souche 34, qui dégrade les HAP, a néanmoins été identifiée grâce au système d'identification des bacilles gram négatif non-fermenteurs API 20 E. Elle fut ainsi associée aux *Ps. putida*, résultat confirmé par les tests supplémentaires décrit dans le Tableau 11. Les souches 19SJ et 78S produisent difficilement le pigment pyocyanine; des *Ps. aeruginosa* apyocyanogènes existent (Ajello et Hoadley, 1976). Le Tableau 12 décrit les tests effectués et l'identification finale.

#### 3.2. Isolats et souches BDP

Quelques isolats et souches BDP ont été testés sur des géloses Pseudomonas Isolation (PI) et MacConkey:

	91	99	103	105	107	110	112	113
PI	+	+	+	-	-	-	+	-
MacConkey	+	+	+	-	-	+	+	-

+:croissance;

Pour obtenir une identification préliminaire plus détaillée, les isolats les plus intéressants du point de vue de la dégradation des HAP, soient les souches 105 et 107, ont été identifiés avec

des galeries API 20 E. Ce système d'identification proposa une identification similaire pour les deux souches, soit *Ps. paucimobilis*. Cette espèce a récemment été reclassifiée dans le nouveau genre *Sphingomonas* (Yabuuchi et al., 1990). Elles sont caractérisées par la formation de petites colonies (1-3 mm) d'un jaune intense non-diffusible. Les souches 105 et 107 ont donc été nommées *Sphingomonas* sp.. L'étudiant à la maîtrise Fadi Dagher (IAF) a effectué l'analyse d'une portion de la séquence des nucléotides du gène de l'ARN ribosomal 16S, et la comparaison avec les banques de données rapproche la souche 107 de l'espèce *Sphingomonas yanoikuyae*.

**TABLEAU 11.** Caractéristiques biochimiques des *Pseudomonas* fluorescents, d'après Bergey's (Krieg et Holt, 1984).

Espèces	Production de pyocyanine	Production de pyoverdine	Croissance à 5°C	Croissance à 42°C	Utilisation du tréhalose	Utilisation du sorbitol	Utilisation du géraniol	Utilisation de l'acétamide
<i>aeruginosa</i>	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>fluorescens</i> biovar I	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>fluorescens</i> biovar II	-	d	+	-	+	+	-	-
<i>fluorescens</i> biovar III	-	+	+	-	d	d	-	-
<i>fluorescens</i> biovar IV	-	+	+	-	+	+	-	-
<i>fluorescens</i> biovar V	-	d	d	-	d	d	-	-
<i>chlororaphis</i>	-	d	+	-	+	-	-	-
<i>aureofaciens</i>	-	+	+	-	d	-	-	-
<i>putida</i> biovar A	-	+	d	-	-	-	-	d
<i>putida</i> biovar B	-	d	+	-	-	d	-	d

+: 90% et plus des souches sont positives;

-: 10% et moins sont positives;

d: entre 11 et 89% des souches sont positives.

TABLEAU 12. Identification des souches bactériennes HAP+ provenant de la Sablière Thouin. D'après les caractéristiques décrites au Tableau 11.

# Souches	Identification préliminaire	Pyocyanin	Pyoverdin sur BK	croiss. à 42°C	croiss. à 5°C	tréhalose	sorbitol	acétate	géraniol	identification confirmée
6	<i>Ps. fluorescens</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6T	-	-	-	-	+	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
6B	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
6J	-	-	-	-	+	+	+	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
18	<i>Ps. fluorescens</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	-
18G	-	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
18P	-	-	++?	++?	++	+	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
19	<i>Ps. fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
19R	-	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
19SJ	-	?	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
19SV	-	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
28	<i>Ps. fluorescens</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
32-2	<i>Ps. fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
32-2S	-	+m	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
32-2R	-	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
34	<i>Chromobacterium</i>	-	+	-	+	+*	-	+	-	<i>Ps. putida</i>
38	<i>Ps. putida</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
46	grp. <i>Ps. fluoresc.</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
48	<i>Ps. fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
50	<i>Ps. fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
57	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
59	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	++	+	++	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
60	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
61	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-?	-	+	+	+	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
62	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
63	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
65	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
67	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
69	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
73	grp. <i>Ps. fluoresc.</i>	-	+	-	+	+	-*	-	-	<i>Pseudomonas</i> sp.
76	<i>Ps. aeruginosa</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
77	<i>Ps. fluorescens</i>	-	+	-	+	+	+	-	-	<i>Ps. fluorescens</i>
78	<i>Ps. fluorescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
78R	-	+m	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
78S	-	?	+	+	-	-	-	+	+	<i>Ps. aeruginosa</i>
UG2				+	-	-	-	-	-	<i>Ps. aeruginosa</i>

## **4. ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION DES HAP**

### **4.1. Expériences en milieux solides**

#### **4.1.1. Recherche des métabolites dans la gélose**

Ce test a été développé afin de vérifier si le HAP est effectivement disparu de la zone d'éclaircissement et non seulement solubilisé lors de l'utilisation de la méthode par pulvérisation. Pour ce faire, la gélose se trouvant à l'intérieur des zones d'éclaircissement a été analysée. Les souches 6T, 6B et 6J n'ont pu produire une zone dans le naphthalène uniquement quand elles ont été cultivées sur des géloses TSA. Puisqu'un pigment jaune apparaissait alors, la gélose fut analysée et un sous-produit probable de la transformation du naphthalène identifié: le coumarin (voir Annexe A). Ce produit n'a pas été observé avec d'autres souches Thouin dégradant le naphthalène. Aussi, l'analyse des halos autour de colonies de la souche 19SJ avec le naphthalène a permis d'identifier le naphthalénol et aussi, après dérivation de la phase étherée, l'acide salicylique (voir Annexe A). L'isolement des ces intermédiaires de dégradation indique donc que le naphthalène était effectivement dégradé, plus ou moins complètement.

#### **4.1.2. Addition de salicylate de sodium**

L'ajout de salicylate de sodium pourrait accélérer la formation de zones par des souches avec le naphthalène, mais aussi avec d'autres HAP. Ceci permettrait d'améliorer la dégradation et d'obtenir de l'information sur la voie catabolique impliquée.

##### **4.1.2.1. Analyses préliminaires**

Lors de l'essai initial, les souches 18G, 57, 19R et 78R ensemencées sur des géloses BHY contenant 50 ppm de salicylate ont formé des zones beaucoup plus rapidement dans le naphthalène et le phénanthrène comparativement au milieu sans salicylate. Ainsi, un éclaircissement

apparaissait déjà 4 heures après la pulvérisation du phénanthrène sur les géloses contenant du salicylate, comparativement à plus de 24 heures sur le milieu sans salicylate. Après 48 heures, le diamètre des zones était toujours au moins deux fois plus grand sur le milieu avec salicylate. On pouvait également observer l'accumulation d'un pigment jaune hydrosoluble autour des colonies de 18G et 57 inoculées sur des géloses avec salicylate recouvertes de naphthalène. Toutefois, l'effet stimulateur de l'addition de salicylate sur la vitesse de formation et sur le diamètre des zones paraissait plus important pour les souches 19R et 78R que 18G et 57.

Lorsque du biphényle était pulvérisé sur des géloses BHY, parmi toutes les souches Thouin HAP+, seules les souches 6T, 6B, 6J et (faiblement) 57 ont réagi en formant une zone et un pigment jaune. Toutefois, chez toutes les autres souches testées habituellement négatives l'addition de salicylate induit la formation d'un pigment et d'une zone d'éclaircissement (18G, 19R, 34, 57 et un peu 78R). Le même milieu dépourvu d'extrait de levure a été négatif.

L'effet de l'addition de salicylate (50 ppm) dans les géloses BHY a été étudié avec quelques souches et HAP. En présence de salicylate, les souches déjà connues pour former des zones avec le naphthalène et le phénanthrène formaient des zones plus grandes et plus rapidement qu'en absence de salicylate. De plus, les souches 6TBJ ont formé une zone et un pigment rouge diffusible avec le naphthalène. Les souches 34 et 32R ont produit un pigment rose-orangé avec le phénanthrène, ce qui n'avait jamais été observé auparavant sur des géloses BHY sans salicylate. La présence de salicylate a aussi induit la formation de zones d'éclaircissement avec l'acénaphthylène alors que, sans salicylate, seule une pigmentation brune était observée. La formation des zones d'éclaircissement avec le fluorène et l'anthracène était également favorisée (Tableau 13).

#### 4.1.2.2. Comparaison de l'effet du salicylate avec le naphthalène et l'acide hydroxy-naphtoïque

Les trois souches Thouin 6B, 19R et 57 ont été testées par la méthode de pulvérisation sur des géloses BHY contenant différents suppléments: du salicylate à 50 ou 200 ppm (SAL 50 ou 200), du naphthalène (NAP) ou de l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque (1H2N). Un témoin sans

supplément a servi de comparaison (CONT). Deux heures après la pulvérisation, les pigments jaunes avec le fluorène et le biphényle étaient déjà visibles dans les géloses avec salicylate ou naphthalène comme suppléments. Le Tableau 14 montre que le naphthalène pourrait stimuler la dégradation de certains HAP. Ainsi, des zones et colorations apparaissaient ou étaient plus importantes en présence de naphthalène dans la gélose. D'autre part, dans certains cas, une concentration trop élevée de salicylate a semblé avoir un effet inhibiteur, les zones étant plus petites avec l'acénaphthylène et le biphényle.

#### 4.1.2.3. Détermination de la concentration optimale de salicylate

Une expérience a été effectuée pour savoir si des doses élevées de salicylate peuvent inhiber la formation de zones d'éclaircissement sur des géloses BHY, et ainsi déterminer la concentration optimale à utiliser. Des géloses contenant 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 et 500 ppm de salicylate ont été préparées. Le fluorène et le phénanthrène ont été pulvérisés sur ces géloses ensemencées avec des souches Thouin sélectionnées (18G, 19SJ, 19R, 32S, 34, 57 et 62).

Les géloses ont été observées après 24h d'incubation à 22°C. Plus la concentration de salicylate était élevée, plus le pigment jaune abondait sur les géloses recouvertes de fluorène et plus la croissance était forte sur les géloses avec phénanthrène. Toutefois, le diamètre des zones n'était proportionnellement pas supérieur quand la concentration de salicylate dépassait 100 ppm. Toutes les souches testées réagissaient au salicylate de façon similaire, sauf *Ps. putida* 34 qui était peu stimulée et *Ps. fluorescens* 62 qui produisaient même des zones moins grandes à des doses supérieures à 50-100 ppm. L'effet stimulateur du salicylate serait donc plus important pour *Ps. aeruginosa* que pour *Ps. fluorescens* ou *Ps. putida*.

**Tableau 13.** Effet de la présence de salicylate de sodium (50 ppm) dans la gélose lors de l'analyse des souches Thouin avec la méthode par pulvérisation des HAP. Observations après 48 heures d'incubation.

	Souches										
Acénaphthylène	6TBJ	18G	19R	57	62	69	73	76	77	78S	78R
avec salicylate	+	++++b	++++b	++++b	+b	++b	+b	++b	++b	+b	++++b
sans salicylate	-	b	b	b	b	b	b	b	b	-	-

	Souches										
Fluorène	6TBJ	18G	19R	57	60	67	69	73	76	77	78R
avec salicylate	-	+++J	+++J	++++J	+++J						
sans salicylate	-	j	j	+j	j	j	j	j	j	j	j

	Souches							
Anthracène	18G	19R	57	78R	34	6T	6B	6J
avec salicylate	+++r	+++r	+++r	+++r	+++r	-	-	-
sans salicylate	++	++	+	++	+	-	-	-

+ à ++++: intensité de la zone d'éclaircissement;  
 r: pigment rosé diffusible;  
 J/j: pigment jaune diffusible intense/faible;  
 b: pigment brun non-diffusible;

**TABLEAU 14.** Formation de zones d'éclaircissement sur géloses contenant différents suppléments (salicylate de sodium, naphthalène, acide 1-hydroxy-2-naphtoïque). Résultats après 24h d'incubation. Méthode par pulvérisation des HAP.

HAP	Souches	SAL 50	SAL 200	NAP	1H2N	CONT
Naphthalène	6B	-	-	-	-	-
	19R	+	++	+	++	+
	57	+	++	+	++	+
Acénaphthylène	6B	++b	b	-	-	-
	19R	++++B	+++	b	-	-
	57	+++B	+++	b	-	-
Biphényl	6B	+j	j	+J	+J	j
	19R	++J	+o	j	-	-
	57	+++J	++o	j	-	-
Fluorène	6B	-	-	-	-	-
	19R	+++J	++++J	+j	j	j
	57	+++J	++++J	+j	j	j
Phénanthrène	6B	-	-	-	+	+
	19R	+++	+++	++	+	+
	57	+++	+++	++	+	+

SAL 50: 50 ppm de salicylate;  
 SAL 200: 200 ppm de salicylate;  
 NAP: 70 ppm de naphthalène;  
 1H2N: 70 ppm d'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque;  
 CONT: témoin;  
 j/J: pigment jaune pâle/foncé diffusible;  
 o: pigment orange/rosé;  
 b/B: pigment brun pâle/foncé non-diffusible.

## **4.2. Expériences en cultures liquides**

Il importe que les bactéries possèdent la capacité de croître en culture liquide avec des HAP comme substrat car la production et l'analyse des biosurfactants se fera en condition aqueuse.

### **4.2.1. Essais préliminaires**

Comme premier essai, plusieurs souches et isolats Thouin HAP+ (6, 18, 19, 19R, 19S, 19SV, 19SJ, 32, 32S, 32R, 34, 38, 46, 48, 50, 57, 59, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 77, 78R et 78S) ont été cultivés en BH additionné de 0,05% d'extrait de levure et de 100 ppm de phénanthrène (une série de flacons équivalents sans phénanthrène était menée comme témoin). Chaque flacon futensemencé avec un inoculum croissant sur gélose TSA, puis incubé à 26°C avec agitation. La souche *Ps. aeruginosa* 19SJ fut également cultivée dans les mêmes conditions sans addition d'extrait de levure mais avec un inoculum plus concentré (l'équivalent d'une dizaine de colonies) pour vérifier si l'ensemencement avec un fort inoculum pourrait permettre d'éviter l'addition de suppléments.

Après trois jours d'incubation, des signes d'utilisation du phénanthrène étaient visibles dans les culturesensemencées avec 19, 19R, 19S, 19SV, 19SJ, 32, 32S, 32R, 38, 57, 59, 62, 63, 65, 69, 73, 76, 77, 78R et 78S: croissance (turbidité) supérieure aux témoins sans phénanthrène, la disparition des cristaux (et de l'odeur) d'hydrocarbures et l'apparition d'une coloration orangée hydrosoluble. Les mêmes indices d'utilisation du phénanthrène étaient observés dans la culture sans extrait de levureensemencée avec une forte dose de cellules de 19SJ, suggérant que l'ajout d'extrait de levure ne soit peut-être pas essentiel.

### **4.2.2. Essai de dosage des HAP résiduels**

Les souches 19R, 19SV et 78R ont été cultivées en BH avec 100 ppm de phénanthrène. Après six jours d'incubation, une légère augmentation de la turbidité ainsi que l'apparition d'une

pigmentation rose-orangée suggéraient l'utilisation du phénanthrène. Aucun phénanthrène résiduel n'a pu être détecté après extraction et analyse par GC-FID.

#### **4.2.3. Addition de salicylate en culture liquide**

Puisque le salicylate de sodium semblait parfois induire la voie catabolique du naphthalène lors des essais en milieux gélosés, quelques essais furent effectués en présence de salicylate de sodium (100 ppm).

##### **4.2.3.1. Analyses préliminaires**

Une première expérimentation avec le salicylate a consisté à cultiver les souches 19R et 57 en BH avec 100 ppm de phénanthrène ou de fluorène. Deux séries de cultures furent préparées, avec ou sans salicylate de sodium (100 ppm). Des colonies formant des zones d'éclaircissement sur des géloses BHYS recouvertes de phénanthrène ou de fluorène ont été resuspendues dans du BH et utilisées comme inoculum. Après moins de 24 heures d'incubation, les milieux avec phénanthrène et salicylate présentaient une teinte orange foncée et les cristaux d'hydrocarbures avaient disparu de la surface du liquide, indiquant une dégradation du HAP. Les cristaux avaient également disparu des cultures avec fluorène et salicylate, et le milieu était d'un jaune brillant. Les cultures sur phénanthrène sans salicylate avaient également une légère teinte orangée. Ces observations indiquent que le salicylate semble également favoriser la biodégradation en culture liquide.

Après 24 heures d'incubation, les quatre cultures-témoins sans salicylate ont reçu 100 ppm de salicylate, de fluoranthène et de pyrène. Un flacon identique non inoculé a aussi été préparé comme témoin abiotique. Les flacons ont été incubés durant sept jours à 30°C et 175 rpm puis extraits afin de déterminer la quantité d' HAP résiduels. La teinte jaune des milieux avec fluorène avait lentement diminué après avoir atteint un maximum environ deux jours après l'ajout de salicylate. La culture de la souche 19R avec le phénanthrène présentait une teinte orangée plus

prononcée que celle avec la souche 57. Environ 20% du fluorène était dégradé dans les deux cultures et 60% (souche 19R) à 70% (souche 57) du phénanthrène. En tenant compte de la marge d'erreur que les méthodes d'extraction, de séparation et de quantification comportent, surtout pour les HAP de haut poids moléculaire, aucune dégradation du pyrène n'a pu être détectée. Par contre, il est possible qu'une légère dégradation (10-15%) du fluoranthène ait eu lieu dans la culture de 19R avec le fluorène.

Les souches 6J, 19R, 57, 34 et 62 ont également été cultivées dans du BH supplémenté de 100 ppm de salicylate et de naphthalène, dans les mêmes conditions que précédemment. La croissance des souches de *Ps. aeruginosa* 19R et 57 a été beaucoup plus rapide que celle de *Ps. fluorescens* 62 et *Ps. putida* 34. Aucune croissance de la souche *Pseudomonas* sp. 6J n'a été observé.

#### 4.2.3.2. Effet du salicylate sur l'utilisation du phénanthrène

Une expérience a été effectuée afin de comparer la croissance des souches 19R, 34 et 62 dans 100 ppm de phénanthrène avec ou sans addition de 100 ppm salicylate. Des flacons Erlenmeyer contenant du BH avec ou sans salicylate ont étéensemencés puis incubés à 29°C sous une agitation de 200 rpm. Les inocula provenaient de cultures de 24 heures dans du BH contenant 300 ppm de salicylate sous les mêmes conditions; la souche 34 croissait plus lentement ou difficilement sur le salicylate que les souches 19R et 62. L'inoculum était donc adapté à l'utilisation du salicylate. Les cultures furent arrêtées après cinq jours d'incubation et la concentration du phénanthrène résiduel déterminée dans les cultures de 19R et 34 en BHS.

La croissance (turbidité) et l'intensité du pigment orangé caractéristique de la dégradation du phénanthrène a été observée après un et cinq jours d'incubation (Tableau 15). La croissance et l'apparition du pigment orange-rosé étaient plus rapide en présence de salicylate. Après avoir atteint un maximum, l'intensité du pigment diminuait. La détermination du phénanthrène résiduel dans les cultures de 19R et 34 en BHS a indiqué une disparition complète de l'hydrocarbure

aromatique. La pigmentation orangée de l'éther d'extraction suggérait toutefois qu'une portion du phénanthrène dégradé se retrouvait sous la forme d'intermédiaires métaboliques.

#### 4.2.3.3. Comparaison du salicylate avec le naphthalène

L'effet de l'addition de naphthalène (200 ppm) ou de salicylate (100 ppm) sur la dégradation du fluorène et du phénanthrène a été étudié. La souche *Ps. aeruginosa* 19SJ était cultivée en BH.

Après une journée d'incubation, les colorations caractéristiques indiquant la dégradation des HAP commençaient à apparaître dans les milieux avec salicylate: une teinte jaune brillante dans les cultures avec fluorène et orangé dans celles avec phénanthrène. À deux jours, les couleurs commençaient aussi à se manifester dans les milieux avec naphthalène, alors que dans les cultures avec salicylate le jaune du fluorène disparaissait et l'orangé du phénanthrène s'intensifiait. Après quatre jours d'incubation, le pigment jaune des cultures avec fluorène était presque complètement disparu alors que la couleur orange du phénanthrène était au maximum. Aucune coloration ne s'est manifestée dans les cultures sans supplément. La turbidité (densité optique à 600 nm) n'a pas significativement changé durant les six jours d'incubation dans aucune des cultures. La Figure 14 montre que, malgré l'apparition du pigment jaune brillant indiquant une dégradation partielle, le fluorène n'a pas été utilisé comme substrat, la différence avec le témoin abiotique étant non significative (la diminution était essentiellement due à la volatilisation du fluorène).

Nos résultats montrent que l'ajout de salicylate de sodium (100 ppm) en culture liquide favorise la dégradation du phénanthrène et provoque l'accumulation de pigments, ce qui confirme les observations effectuées en milieu solide. La présence de naphthalène peut également favoriser la biodégradation, mais moins efficacement que le salicylate.

**TABLEAU 15.** Évaluation de la croissance de trois souches de *Pseudomonas* en milieu minéral

BH contenant 100 ppm phénanthrène avec ou sans salicylate de sodium.

Observations effectuées après un et cinq jours d'incubation à 29°C avec une agitation de 200 rpm.

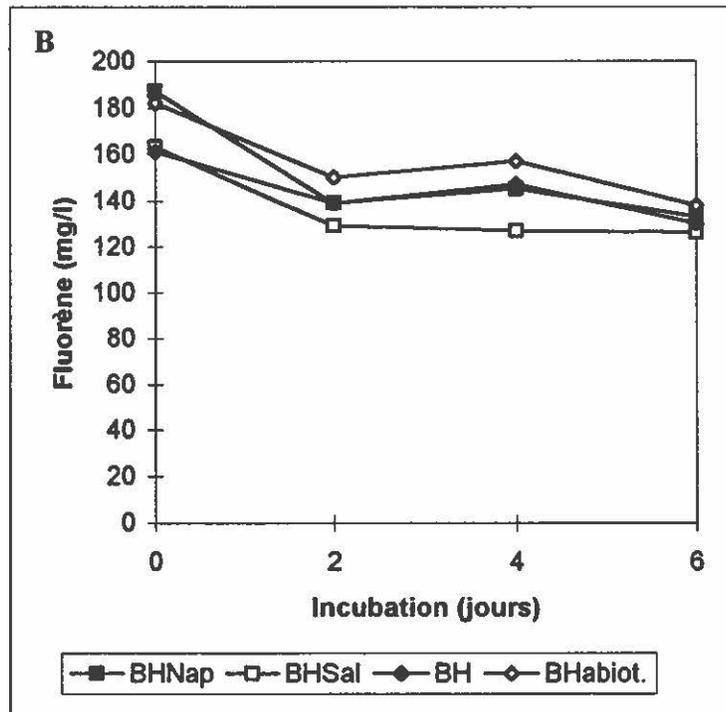
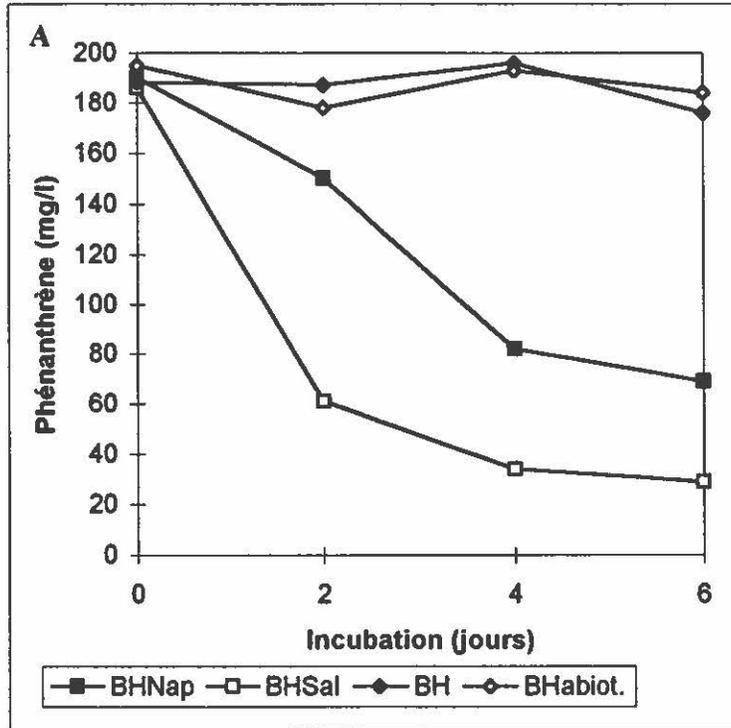
1 jour	19R	34	62	5 jours	19R	34	62
BH	+o	++o	-	BH	+O	++O	+O
BHS	++O	+O	+j	BHS	++++o	+++o	++o

Croissance relative: - à ++++;

Coloration du milieu de culture: (jaunâtre) j, o, O (orange foncé);

**FIGURE 14.** Cinétique de dégradation du fluorène et du phénanthrène par la souche

*Ps. aeruginosa* 19SJ en BH additionnée de 100 ppm salicylate (BHSal) ou de 200 ppm naphthalène (BHNap). Trente-deux flacons Erlenmeyer furent préparés, huit pour chaque temps d'incubation (1 heures, 2 jours, 4 jours et 6 jours). Chaque groupe de huit était composé de deux séries de quatre flacons, l'une avec 200 ppm de phénanthrène et l'autre avec 200 ppm de fluorène. Enfin, chaque série comprenait un flacon sans supplément, un avec 100 ppm salicylate, un avec 200 ppm naphthalène et un abiotique. À chacun des temps prévus, le contenu complet des huit flacons était extrait et la concentration résiduelle de phénanthrène ou de fluorène déterminée.



#### **4.2.4. Étude de facteurs affectant la biodégradation des HAP par les souches Thouin.**

Dans les expériences rapportées ci-dessous, plusieurs facteurs pouvant affecter la dégradation des HAP, dont l'addition de suppléments nutritifs ou de surfactants synthétiques et l'utilisation d'un milieu favorisant la production de biosurfactants, furent étudiés.

##### **4.2.4.1. Essai en milieu liquide avec six HAP**

Les souches 34 et 19R ont été cultivées en BHS avec une mixture de HAP (naphtalène, acénaphthylène, fluorène, anthracène, fluoranthène et pyrène; à raison de 100 ppm chacun). Le phénanthrène a été omis car son temps de rétention est trop similaire à celui de l'anthracène lors de la séparation au GC-FID. Quatre conditions de culture différentes ont été étudiées: [1] sans supplément, [2] avec 2 mM du surfactant non ionique: Brij 35 (Tiehm, 1994), [3] avec 0,1% d'extrait de levure et de protéose peptone (PPYE), [4] ensemencement avec une culture de six jours en BHS et 2% mannitol (donc contenant des biosurfactants et peut-être du mannitol résiduel) et finalement un témoin (BHS avec HAP) non-inoculé. Les cultures [1] à [3] furent ensemencées avec 5 ml d'une culture de 24 heures en BH avec 1,5% salicylate, et les deux flacons [4] avec une suspension de la culture en BHS avec mannitol ayant une DO équivalente. Les cultures furent incubées pendant 13 jours, puis les HAP résiduels dosés par GC-FID.

Après 24 heures d'incubation, seules les cultures ensemencées avec la pré-culture sur mannitol contenant du biosurfactant [4] avaient commencé à croître et produire un pigment orangé. Après 48h, celles avec PPYE [3] et Brij 35 [2] commençaient elles aussi, les cultures avec surfactant démontrant la teinte orangée la plus intense. Dans le milieu BHS [1] il fallut trois jours pour voir l'apparition d'un pigment jaune avec la souche 34 et six jours avec la souche 19R. À la fin de l'incubation, l'analyse du témoin abiotique indiquait que le naphtalène s'était complètement volatilisé, rendant impossible la détermination de la fraction dégradée. L'acénaphthylène était complètement disparu dans toutes les cultures, mais il n'en restait que 5% dans le témoin abiotique. Quoique environ 45% du fluorène s'était également volatilisé, les cultures avec PPYE avaient permis une dégradation d'environ 20 ppm par la souche 19R et 10 ppm par la souche 34.

La comparaison avec le témoin abiotique permet d'estimer une dégradation de l'anthracène se situant entre 25 et 35 ppm dans les milieux BHS sans supplément, BHS avec PPYE et BHS avec biosurfactants. Par contre, les cultures avec le surfactant synthétique Brij 35 ont permis une dégradation complète de l'anthracène, ainsi que du fluorène. L'erreur expérimentale inhérente rend difficile l'analyse des résultats pour les HAP de plus haut poids moléculaire. Les chromatogrammes suggèrent toutefois une légère dégradation du fluoranthène par la souche 19R dans le milieu BHS sans supplément et par la souche 34 dans le milieu additionné de Brij 35.

#### 4.2.4.2. Étude préliminaire de la croissance sur l'anthracène en présence d'un surfactant synthétique

Les souches 38 et 19SJ ont été cultivées en BHS dans les conditions de culture suivantes: [1] avec 100 ppm anthracène, [2] avec 2 mM Brij 35 et 100 ppm anthracène, [3] avec 2 mM de Brij 35, pour vérifier si ce surfactant peut servir de substrat, [4] sans supplément, pour comparer la croissance avec l'addition d'anthracène, et finalement un témoin abiotique avec anthracène. Les flacons furent ensemencés avec des cellules cultivées en milieu liquide avec 200 ppm salicylate et 100 ppm naphthalène pendant 24 heures, puis incubés.

Après 17 jours d'incubation à 24°C à une agitation de 200 rpm, la culture de 19SJ dans le BHS avec anthracène était devenue jaune-orange. Une bonne croissance de la souche 38 dans BHS avec Brij 35 et anthracène était également évidente, et le milieu présentait une coloration rosée. Aucune croissance significative ou indice de biodégradation de l'anthracène n'était apparent dans les autres flacons.

#### 4.2.4.3. Étude de la biodégradation du phénanthrène en milieu SW avec mannitol

Une expérience préliminaire a été effectuée afin de savoir si la présence de mannitol affectait la dégradation du phénanthrène (100 ppm). Le mannitol est utilisé comme substrat pour la

production de biosurfactants. Les souches 19R, 34 et 62 ont été cultivées pendant cinq jours dans: [1] le BH, [2] le BHS, [3] le BH avec 2% mannitol, et [4] le BHS avec 2% mannitol.

La croissance et les signes de dégradation du phénanthrène ont été observés dans toutes les cultures (Tableau 16). L'apparition du pigment orangé et la disparition des cristaux suggéraient la dégradation du phénanthrène. Cependant, la concentration résiduelle dans les cultures avec mannitol n'a pu être déterminée à cause de la formation d'une émulsion très stable lors de l'extraction de la culture à l'éther. Aucun phénanthrène résiduel n'a été détecté dans les cultures de 19R et 34 dans le BHS.

Une autre expérience a permis d'étudier l'influence d'un milieu conçu pour la production de biosurfactants sur la biodégradation du phénanthrène par la souche 19SJ. Il importait de savoir si des conditions favorables à la production de biosurfactants permettaient également l'utilisation d'un HAP. Les conditions de culture suivantes furent essayées: [1] BH , [2] BH avec 2% mannitol, [3] SW et [4] SW avec 2% mannitol. Toutes les cultures contenaient également 100 ppm de naphthalène, en remplacement du salicylate, pour stimuler l'utilisation du phénanthrène.

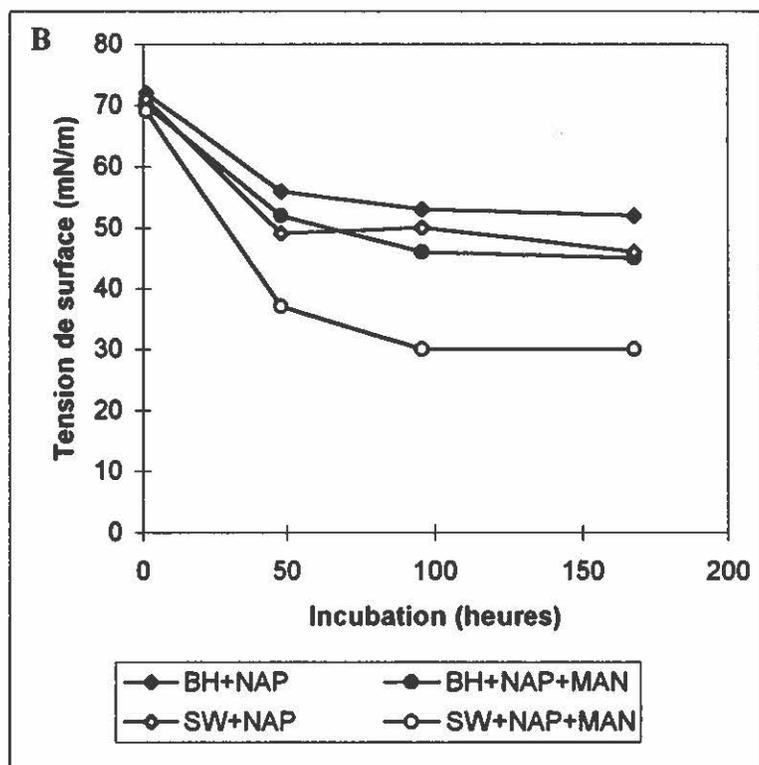
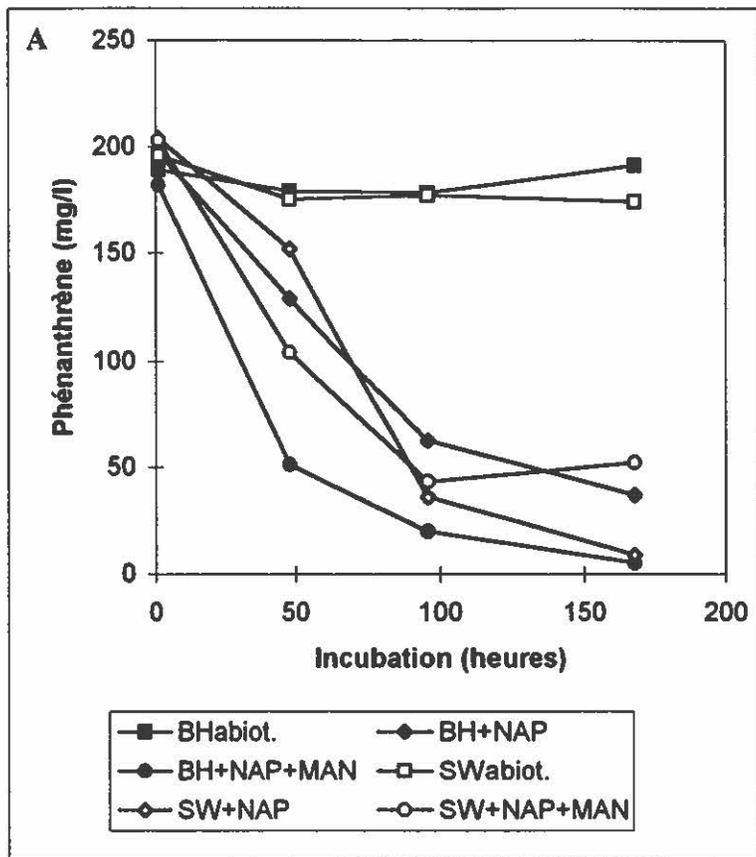
La cinétique de biodégradation du phénanthrène nous permet de constater que la présence du substrat plus disponible n'empêche pas l'utilisation du phénanthrène, et que le milieu SW autorise la dégradation du phénanthrène (Figure 15). Il n'y aurait donc pas de préférence pour le substrat plus soluble. Seul le milieu SW avec le mannitol a permis une production de biosurfactants suffisante pour diminuer la tension superficielle au seuil minimal de 30 mN/m, soit la CMC (Figure 15). Ce biosurfactant ne semble toutefois pas avoir eu d'influence sur la biodégradation du phénanthrène.

**TABLEAU 16.** Comparaison de la croissance (turbidité) et des indices de dégradation (pigment orangé) du phénanthrène par trois souches bactériennes isolées de la Sablière Thouin. Cultures en milieu minéral BH avec différents suppléments.

Jours	BH		BHS		BHMan		BHSMan	
	1	5	1	5	1	5	1	5
19R	3/+	4/+	4/++	3/+++	2/+	4/++	4/++	3/++++
34	2/++	4/+	3/+	3/++	2/++	3/+++	4/++	3/++++
62	0/-	3/+	2/+	2/++	0/++	3/+++	1/++	2/++++

Intensité du pigment orangé: (nul) 0 à 5 (max.)  
 Croissance(turbidité): (minimale) - à +++++ (maximale);  
 BH: milieu de culture Bushnell-Haas;  
 BHS: milieu BH avec 100 ppm de salicylate;  
 BHMan: milieu BH avec 2% mannitol;  
 BHSMan: milieu BHS avec 2% mannitol.

**FIGURE 15.** Influence d'un milieu de culture conçu pour la production de biosurfactants sur la dégradation du phénanthrène par la souche *Ps. aeruginosa* 19SJ. Incubation à 30°C et 200 rpm. Des flacons BH et SW non-ensemencés servirent de témoins abiotiques lors des déterminations du phénanthrène résiduel. [A] Cinétique de disparition du phénanthrène, [B] Cinétique de diminution de la tension superficielle du milieu de culture, indiquant la production de biosurfactants. BH : milieu de culture minéral BH, SW : milieu de culture SW, MAN : 2% mannitol, NAP : 100 ppm de naphthalène, abiot. : milieux non-ensemencés.



#### **4.2.5. Essais de biodégradation du fluoranthène et du pyrène par les souches Thouin**

Puisque les souches Thouin ne formaient pas de zones d'éclaircissement avec le fluoranthène ou le pyrène, des HAP aux poids moléculaire plus élevés que le phénanthrène et l'anthracène, leur biodégradabilité a été testée en cultures liquides.

##### **4.2.5.1. Dégradation du fluoranthène en présence de mannitol ou de surfactant synthétique**

Les souches 19R, 34, 57 et 62 furent cultivées dans trois milieux différents en présence de fluoranthène (100 ppm): [1] BHS, [2] BHS avec 200 ppm du surfactant Tween 80 (Mueller *et al.*, 1990) et [3] BHS avec 2% mannitol (pour favoriser la production de biosurfactants). Les cultures ont étéensemencées avec 1 ml (2 ml de 34) d'une culture de 24 heures en BH avec 300 ppm de salicylate, puis incubées pendant neuf jours à 29°C avec une agitation à 200 rpm.

Lors de l'addition du surfactant Tween 80 aux cultures on pouvait observer une solubilisation immédiate du fluoranthène: le milieu de culture devenait blanc laiteux et opaque, sans cristaux visibles. Toutefois, après 24 heures d'incubation des souches 19R, 34 et 57, la mousse et l'opacité avaient significativement diminuées, alors que des cristaux faisaient leur apparition à la surface du liquide, ce qui suggérait une dégradation du Tween 80. La croissance était également visuellement plus forte dans les cultures avec Tween 80 comparativement aux cultures sans surfactant. Ces observations suggèrent que le Tween 80 fut utilisé comme substrat. Après neuf jours d'incubation, le fluoranthène résiduel et les métabolites éventuels furent extraits afin d'être quantifiés. Seule l'éther d'extraction de la souche 34 cultivée dans le BHS avec 2% mannitol présentait une coloration (jaune), suggérant la présence d'intermédiaires de dégradation. Ce fut en effet la seule culture où une réduction probablement significative de la concentration de fluoranthène a été observée, la diminution des autres se situant à l'intérieur d'une marge d'erreur de 15%.

#### 4.2.5.2. Dégradation du fluoranthène et du pyrène en présence d'un surfactant synthétique

Des cultures en BHS avec 100 ppm de fluoranthène et pyrène ont été inoculées avec 19SJ, 34, 57 et 78S cultivées en BHS avec 100 ppm naphthalène pendant 48 heures. Pour augmenter la solubilité des HAP, 2 mM du surfactant Brij 35 (Tiehm, 1994) ont été ajoutées. Les cultures furent incubées pendant 32 jours à 24°C et 150 rpm avant l'extraction.

Après neuf jours d'incubation, seule 78S montrait une croissance significative et deux semaines plus tard toutes les cultures démontraient une certaine croissance, avec une coloration de teinte brun-beige. Toutefois, vers la fin de l'incubation, la culture de la souche 57 était devenue noire et opaque. Lors de l'extraction, l'éther de 19SJ, 34 et 78S était légèrement jaunâtre alors que celui de 57 était d'un rouge très foncé. La très forte croissance de cette dernière était soulignée par la pigmentation noire des bactéries.

À cause des problèmes de la grande variabilité typique des analyses des HAP de haut poids moléculaire, on peut difficilement s'assurer de l'exactitude des résultats. Il semble toutefois y avoir une certaine dégradation du fluoranthène (10 à 20 ppm de diminution) pour chacune des souches testées. Toutefois, lors de la recherche de métabolites de dégradation par triméthylsilylation et analyse au GC-MS, beaucoup plus de substances aromatiques s'étaient accumulées dans le milieu de culture de la souche 57. Une faible dégradation du pyrène par 19SJ, 34 et 78S est probable.

Le fluoranthène et le pyrène semblent donc être plus difficilement biodégradable que les HAP de deux ou trois cycles aromatiques.

#### **4.2.6. Étude de l'activité catabolique des souches *Sphingomonas* sp. 105 et 107**

##### 4.2.6.1. Dégradation du fluorène et du phénanthrène

Une expérience préliminaire a été effectuée pour déterminer le potentiel des souches de *Sphingomonas* 105 et 107 à dégrader 100 ppm de fluorène et 100 ppm de phénanthrène dans des cultures en BH avec Tween 80 (200 ppm). Les flacons furentensemencés avec une suspension de

cellules (concentration finale environ  $10^8$  UFC/ml) cultivées sur TSA, puis incubés à 24°C avec agitation de 150 rpm. Après dix jours d'incubation, aucune trace de fluorène et de phénanthrène ne fut détectée, indiquant une dégradation complète, alors que le témoin abiotique contenait 97 ppm de phénanthrène et 75 ppm de fluorène.

#### 4.2.6.2. Dégradation du fluoranthène et du pyrène

Le potentiel des souches de *Sphingomonas* sp. 105 et 107 à dégrader le fluoranthène ou le pyrène a été testé en milieu liquide. Pour chaque souche cinq flacons ont été préparés, soit: [1] BHYS avec fluoranthène ou pyrène (200 ppm), [2] BHYS et [3] BHYS avec fluoranthène ou pyrène non-ensemencé, comme témoins abiotiques. Les cultures ont été inoculées avec des bactéries formant des zones sur des géloses TSA recouvertes de fluoranthène ou de pyrène (donc des cultures induites ou adaptées), puis incubées pendant six jours pour le fluoranthène ou dix jours pour le pyrène, à 24°C avec une agitation de 100 rpm.

Dans les cultures avec le fluoranthène, une pigmentation orangée brillante est apparue après 24 heures d'incubation pour la souche 107 et 48 heures pour la souche 105. L'extraction et l'analyse au GC-FID ont permis d'évaluer la dégradation du HAP à environ 45 ppm pour la 107 et 35 ppm pour la 105 après six jours d'incubation. Les cultures avec pyrène ont été analysées quatre jours plus tard. Les deux souches avaient dégradé environ 40 des 200 ppm contenus dans les flacons.

#### 4.2.6.3. Effets du salicylate et du Tween 80 sur la dégradation du pyrène par la souche 107

Quatre milieux de culture différents ont été essayés au cours de cette expérience: [1] BH, [2] BHS, [3] BH avec Tween 80 (200 ppm) et [4] BHS avec Tween 80 (200 ppm).

La dégradation a été déterminée après dix jours d'incubation. Les deux suppléments ont favorisé l'utilisation du pyrène par la souche 107. D'importantes différences de croissance et de pigmentation du milieu de culture ont été observées (Tableau 17A). La turbidité (DO) des cultures

avec salicylate était sensiblement plus élevée, alors que les cultures sans Tween 80 avaient une teinte beaucoup plus foncée.

#### 4.2.6.4. Dégradation du fluoranthène, du pyrène, du benz[a]anthracène ou du chrysène par la souche 107

L'expérience précédente a été répétée avec le fluoranthène, le pyrène, le chrysène et le benz[a]anthracène, mais à une température de 30°C et avec une agitation de 200 rpm. La quantité de HAP résiduels a été déterminée après sept jours d'incubation. Seul le pyrène a semblé être dégradé dans les quatre conditions de culture. Le Tableau 17B indique également que la dégradation peut être améliorée par une agitation plus forte et/ou une température d'incubation plus élevée.

Une faible croissance et une coloration orangée indiquaient une certaine transformation dans les cultures avec fluoranthène. Toutefois, les analyses au GC-FID ont démontré une diminution significative (environ 25 ppm) seulement dans la culture supplémentée de salicylate et de Tween 80. Aucune modification évidente des cultures avec benz[a]anthracène ou chrysène n'a été observée. Néanmoins, une légère coloration jaunâtre de l'éther d'extraction des cultures avec benz[a]anthracène enrichies de salicylate et de Tween 80 suggérait une certaine transformation de l'hydrocarbure. La recherche d'intermédiaires de la dégradation par triméthylsilylation et analyse au GC-MS a permis d'identifier un métabolite probable (voir Annexe A).

Les expériences en cultures liquides avec les souches de *Sphingomonas* indiquent qu'elles peuvent dégrader les HAP de quatre cycles aromatiques et que cette activité peut être stimulée par l'addition de salicylate et de Tween 80.

**Tableau 17.** Dégradation du pyrène (200 ppm) par la souche 107 avec et sans salicylate de sodium et Tween 80. Les flacons furentensemencés avec des bactéries en croissance sur le fluoranthène. [A] Incubation à 24°C avec agitation à 100 rpm. Dosage du pyrène résiduel après dix jours d'incubation. [B] Incubation à 30°C avec agitation à 200 rpm. Dosage du pyrène résiduel après sept jours d'incubation.

A.

Aspect de la culture	Croissance minimale (dégradation ppm)	Croissance maximale (dégradation ppm)
noire	BH (1)	BHS (10)
brune	BH+Tw (25)	BHS+Tw (65)

B.

Aspect de la culture	Croissance minimale (dégradation ppm)	Croissance maximale (dégradation ppm)
noire	BH (20)	BHS (65)
brune	BH+Tw (40)	BHS+Tw (95)

Tw: Tween 80 (200 ppm);

BHS: Bushnell-Haas avec 100 ppm de salicylate de sodium.

## **5. BIOPRODUCTION DE SURFACTANTS OU D'ÉMULSIFIANTS**

Au départ la nature des biosurfactants ou bioémulsifiants potentiellement présents étant inconnue, le criblage fut donc basé sur les manifestations de leurs propriétés physiques (Parra *et al.*, 1989; Franczy *et al.*, 1991).

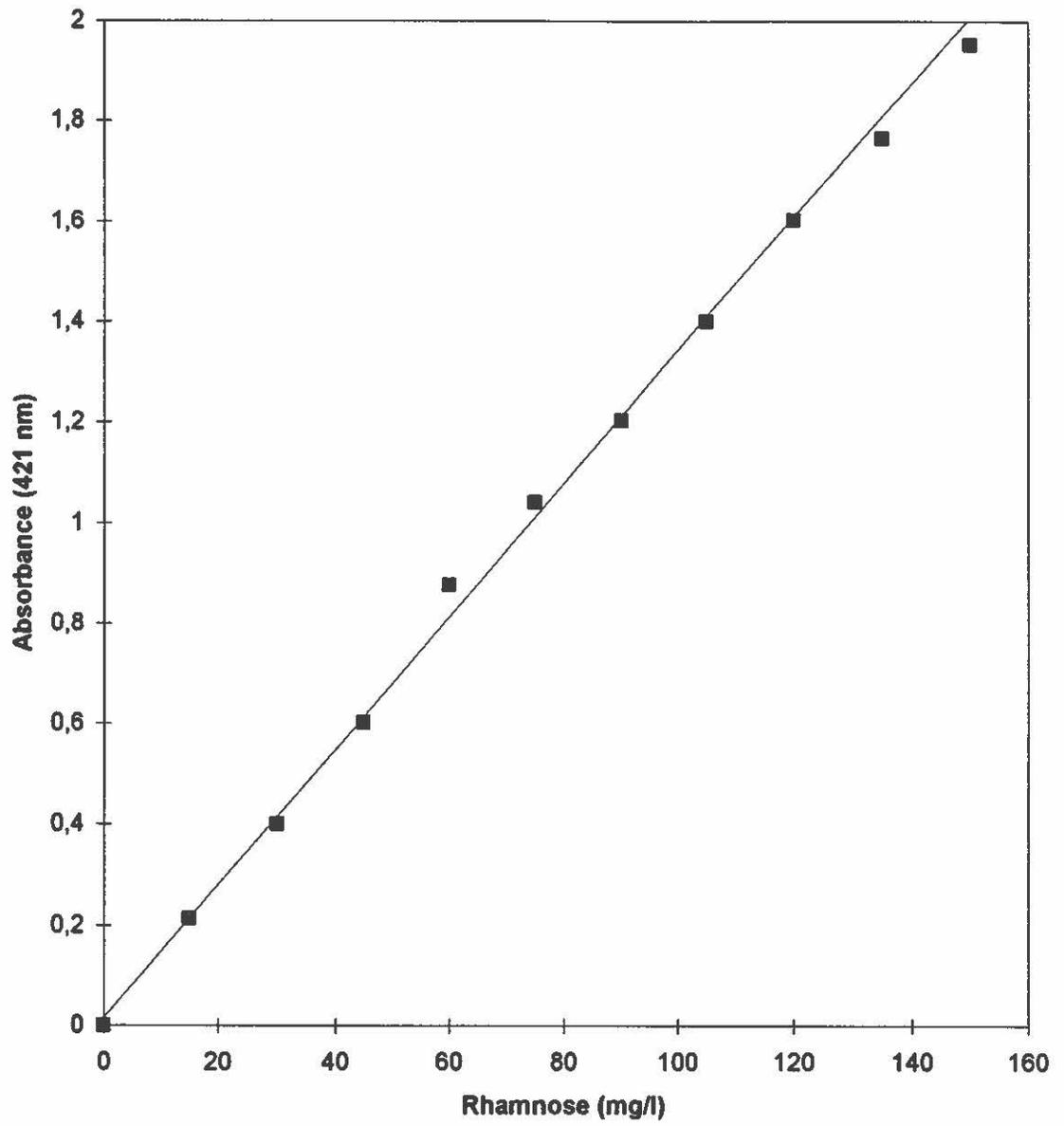
### **5.1. Mise au point des techniques**

La méthode de criblage la plus simple et la plus rapide consiste à observer une réduction de la tension superficielle par le "Drop Collapsing Test". L'évaluation de la sensibilité de cette méthode suggère que la limite de détection se situe aux environs de la CMC. En effet, dans une série de dilutions d'un surnageant contenant du biosurfactant (souche 46 cultivée en présence de 2% dextrose) au-delà de la CMC, la goutte s'effondrait jusqu'à ce que la tension superficielle augmente rapidement, ce qui signifie l'atteinte du seuil correspondant à la CMC.

Dilutions	1/1	1/10	1/80	1/100
TS (mN/m)	32	35	40	72
DCT	+	+	+	-

La concentration de rhamnose dans le milieu de culture est habituellement déterminée par l'une des deux techniques décrites par Chandrasekaran et BeMiller (1980). La méthode moins spécifique mais plus rapide et requérant moins de manipulations a été choisie. Une courbe étalon a été préparée (Figure 16).

**FIGURE 16.** Courbe étalon du rhamnose vs absorbance à 421 nm. Utilisée pour l'évaluation de la concentration des rhamnolipides par l'analyse du rhamnose selon la méthode avec orcinol.



## **5.2. Essai avec la souche de référence UG2**

Un premier essai de production de biosurfactants a été effectué avec la souche de référence *Ps. aeruginosa* UG2. Cette expérience a été effectuée afin de préciser les conditions de culture, la vitesse de croissance, ainsi que le potentiel de production de biosurfactants dans le milieu BH. La diminution de la tension superficielle du surnageant de culture a été suivie dans le temps avec le tensiomètre (Figure 17), ce qui permet d'évaluer la production de biosurfactants. L'atteinte de la CMC est indiqué par le plateau autour de 30 mN/m.

## **5.3. Étude préliminaire des souches dégradant les HAP**

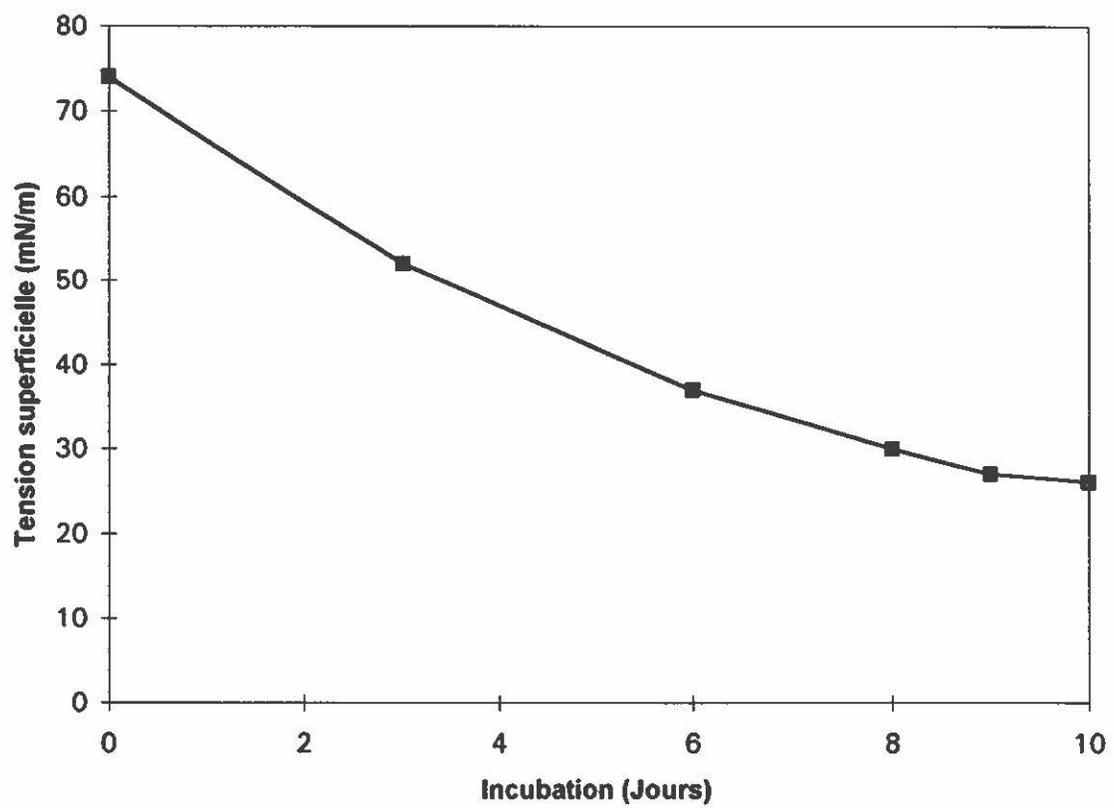
### **5.3.1. Essai en culture liquide avec dextrose**

L'identification des souches utilisant les HAP par pulvérisation a démontré qu'elles appartiennent toutes au genre *Pseudomonas*. Une première expérience pour connaître lesquelles pourraient produire du biosurfactant a donc été effectuée dans des conditions similaires à celles utilisées pour *Ps. aeruginosa* UG2. Plusieurs souches et isolats Thouin et références ont été cultivés en BH avec 2% de dextrose.

La production de biosurfactants a été détectée par le DCT, et confirmée dans certaines cultures avec le tensiomètre (Tableau 18). Toutes les souches de *Ps. aeruginosa* ont manifesté les signes de production de biosurfactants: une mousse abondante s'accumulait à la surface des cultures et le DCT était positif.

**FIGURE 17.** Culture de la souche de référence *Ps. aeruginosa* UG2 en BH avec 2% de dextrose.

Incubation à 22°C avec agitation moyenne (barreau aimanté). Détection de la production de biosurfactants par la diminution de la tension superficielle.



**TABLEAU 18.** Production de biosurfactants par des souches et isolats Thouin cultivées en BH avec 2% dextrose, tel que déterminé par le DCT et la mesure de la tension de surface. Une concentration plus élevée de biosurfactants se manifestera par un effondrement rapide de la goutte (test DCT) et une tension superficielle plus basse. Observations après trois jours d'incubation à 29°C à une agitation de 150 rpm.

	Souches																
Test	18	19	19S	19R	32	34	38	46	48	50	57	59	62	76	78	UG2	PG201
DCT	++	+++	+++	++	+++	-	-	+++	+++	+++	+	-	-	-	+++	+++	-
TS	49	nd	30	55	34	nd	nd	29	28	30	nd	nd	71	nd	nd	31	nd

vitesse d'effondrement de la goutte: lente (+) à rapide (+++);

TS: tension de surface évaluée avec le tensiomètre.

nd : non déterminé

### 5.3.2. Essais avec le milieu gélosé SW

L'usage de géloses bleues SW est restreint par la toxicité du surfactant synthétique inclus dans la formulation, lequel pourrait empêcher la croissance de beaucoup de micro-organismes. En effet, le bromure d'hexadécyltriméthylammonium (cetrimide) est fréquemment utilisé comme agent de sélection pour *Ps. aeruginosa*.

Lors d'une première évaluation, la formation, en moins de 24 heures, d'une légère auréole bleue entourant les puits dans lesquels quelques gouttes d'une solution de biosurfactant avaient été introduites confirmait le potentiel de cette technique.

La plupart des souches Thouin, ainsi que les souches de référence (UG2 et PG201), ont été testées avec le dextrose, le mannitol ou le salicylate de sodium comme substrats, certaines avec le glycérol également. Le dextrose (Guerra-Santos et al., 1984; Jain et al., 1992) et le glycérol (Ochsner et al., 1994a) servent souvent de substrat soluble pour la production de biosurfactants par *Ps. aeruginosa*. Toutefois, plusieurs études (Venkata Ramana et Karanth, 1989; Siegmund et Wagner, 1989; Robert et al., 1989) ont révélé que le mannitol offrirait un rendement supérieur. De plus, nos résultats ont montré que le mannitol contrairement au dextrose ne provoque pas de chute de pH.

La sécrétion de biosurfactants sous forme de glycolipides anioniques a été déterminée par l'apparition d'auréoles bleu foncé autour des colonies sur un fond bleu pâle. Les auréoles indiquant l'accumulation des biosurfactants se formaient plus rapidement avec le dextrose, mais la production (diamètre de l'auréole) était finalement meilleure sur le mannitol (Tableau 19). Aucune croissance ne fut observée avec le salicylate de sodium (1,5%) comme substrat. La toxicité du CTAB est probablement responsable de la croissance faible ou nulle de certaines souches.

### 5.3.3. Essai en milieu BH avec mannitol

Toutes les souches ayant produit une auréole avec le mannitol lors de l'expérience précédente (18G, 19R, 19SV, 19SJ, 32R, 32S, 34, 46, 48, 50, 57, 59, 77, 78S et 78R) ont ensuite

été cultivées en milieu liquide BH avec 2% mannitol. Les cultures étaient incubées à 29°C avec une agitation de 150 rpm. Après 72 heures d'incubation, une bonne croissance de toutes les souches était évidente et certains des *Ps. aeruginosa* produisaient le pigment bleu (pyocyanine) caractéristique. Tous les tubes contenaient une épaisse couche de mousse indiquant la production de biosurfactants, sauf ceuxensemencés avec les souches 59 et 77. La tension superficielle (entre 40 et 45 mN/m) des culturesensemencées avec 19R et 48 indiquait que la quantité de biosurfactants n'avait pas encore atteint la CMC. Un test d'émulsion effectué après neuf jours d'incubation démontra la présence d'une importante activité émulsifiante dans tous les tubes à l'exception de ceuxensemencés avec les souches 59 et 77.

#### **5.3.4. Milieu alternatif pour la production de biosurfactants**

La grande majorité des souches Thouin dégradant les HAP et ne produisant pas de biosurfactants par les méthodes déjà utilisées sont des *Ps. fluorescens*. Les souches ne produisant pas de biosurfactants dans les milieux de culture déjà essayés (6T,B,J; 28-1; 38; 59; 60; 61; 62; 63; 65; 67; 69; 73; 76 et 77) ont été cultivées dans un milieu de sels minéraux différent (qui serait adapté à la production de biosurfactants par *Ps. fluorescens*) avec du sucrose comme substrat. Seules une croissance des souches 6T, 6B, 6J et 61 a été obtenue, sans toutefois de signes de production de biosurfactants.

#### **5.3.5. Cinétique de la diminution de la tension superficielle**

Le suivi de la tension de surface a été effectué lors de la croissance de la souche *Ps. aeruginosa* 32R en BH avec 2% dextrose. On constate (Figure 18) que la tension de surface continue à descendre après le passage de la phase de croissance logarithmique, ce qui montre que la production de biosurfactants se poursuit pendant la phase stationnaire.

**TABLEAU 19.** Détection de glycolipides anioniques (biosurfactants) autour de colonies de souches

Thouin croissant sur des géloses bleues SW. Résultats observés sur des cultures de trois jours incubées à 30°C. La présence d'une auréole autour des colonies indique la sécrétion de glycolipides anioniques.

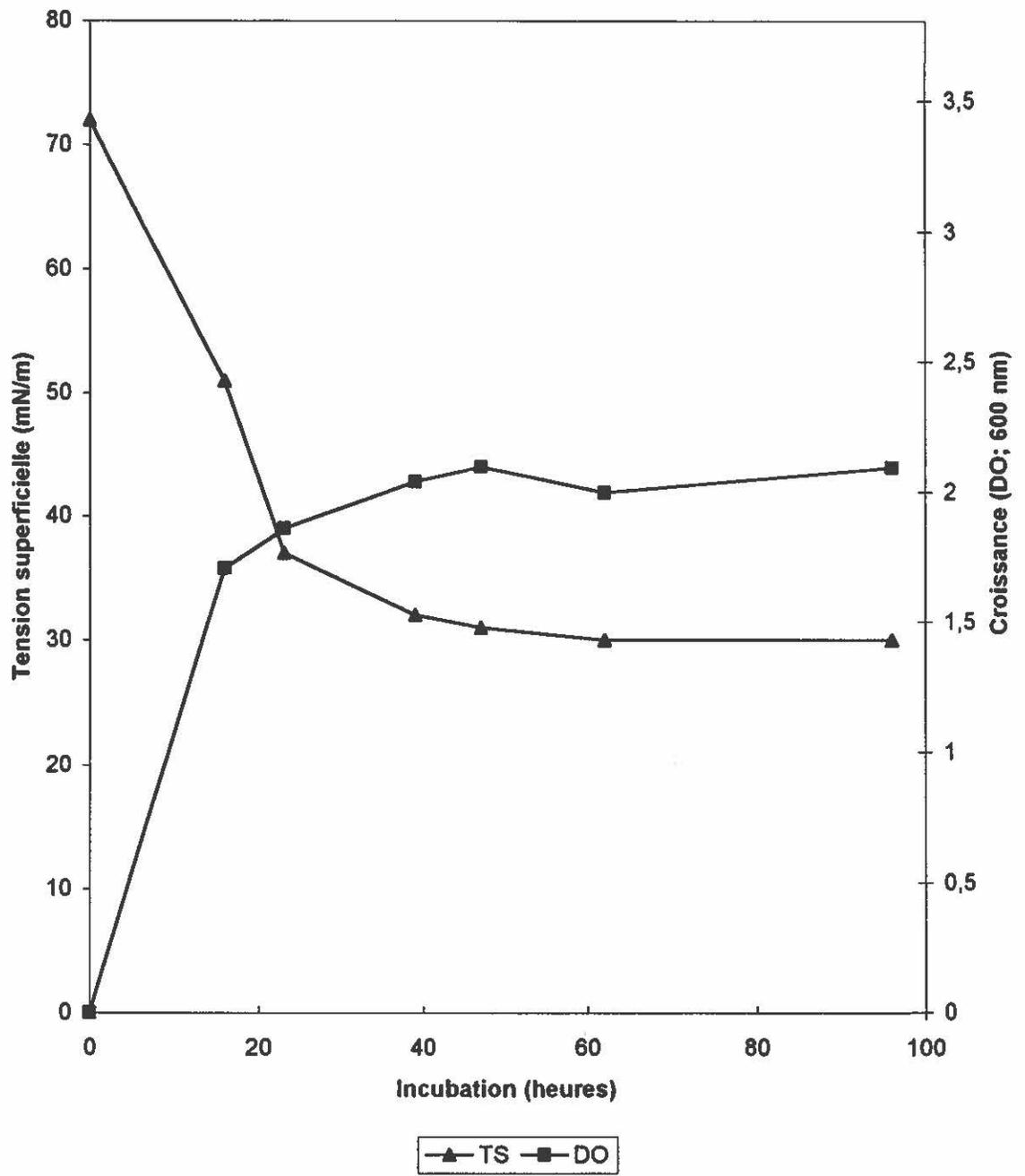
	Souches											
Substrat	19R	19SJ	19SV	34	32R	32S	48	57	78R	78S	UG2	PG201
dextrose	+	+	+	+	+	+	++	++	+	+	++	+
mannitol	+++	++	++	+++	++	++	++	++	++	++	+++	++
glycérol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

auréole: +, petite; ++, moyenne; +++, grande; -, absence.

	Souches																		
Substrat	6T	6B	6J	18G	28	38	46	50	59	60	61	62	63	65	67	69	73	76	77
dextrose	-	-	-	c	-	-	c	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	-	-	-	+	-	c	++	++	+	c	-	-	-	c	c	c	c	-	+

-: aucune croissance; c: croissance seulement; +: croissance et auréole.

**FIGURE 18.** Culture de *Ps. aeruginosa* 32R en BH avec 2% dextrose. Incubation à 29°C avec agitation à 150 rpm. La croissance bactérienne a été déterminée par l'accroissement de l'absorbance à 600 nm et la production de biosurfactants par la mesure de la tension superficielle avec le tensiomètre à anneau.



### **5.3.6. Étude de quelques isolats BDP avec le dextrose**

Plusieurs souches BDP ont été testées pour leur capacité à produire des substances émulsifiantes et tensioactives en BH avec 2% dextrose. Les surmages de culture ont été analysés avec le DCT et le test d'émulsion.

Après cinq jours d'incubation, la présence de mousse à la surface des cultures a été observée (Tableau 20). Une journée plus tard, la diminution de la tension superficielle a été estimée par la méthode DCT, et l'activité émulsionnante évaluée avec le test en tube (afin de rendre ce test plus sensible, du benzène fut utilisé à la place de l'hexadécane). Il est intéressant de remarquer que les souches 105 et 107 ne pouvaient que stabiliser une émulsion, ce qui suggère qu'ils produisent un émulsifiant plutôt qu'un surfactant.

Le criblage des souches capables de dégrader des HAP a démontré que les *Ps. aeruginosa* et *Ps. putida*, ainsi que certaines souches BDP, produisent un biosurfactant en milieu minéral avec 2% dextrose ou mannitol.

### **5.4. Étude et optimisation de la production des biosurfactants**

La capacité des souches Thouin HAP+ à produire des biosurfactants dans le milieu optimal SW fut premièrement testée à l'aide de cultures avec 2% dextrose. La croissance des souches productrices de biosurfactants dans le milieu SW fut également évaluée avec le mannitol (2%).

Le tableau 21 illustre la diminution de la tension superficielle (avec le DCT) et la formation d'une activité émulsifiante après neuf jours d'incubation (les tensions de surface ont été mesurées après six jours d'incubation). Une forte croissance fut également observée en SW avec mannitol (2%), dans lequel toutes les cultures (sauf 6T, B, J) étaient d'un jaune brillant, à cause de production de pyoverdine.

**TABLEAU 20.** Production de biosurfactants et bioémulsifiants par des souches BDP cultivées dans le BH avec du dextrose (2%).  
Incubation à 29°C avec agitation à 100 rpm.

Observation	91A	91B	99A	99B	103A	103B	103C	105	107	110A	110B	110C	112A	112B	112C	113A	113B
mousse	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-
DCT	++	++	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
émulsion	+++	++	-	+	+	-	-	++	+++	-	-	++	-	-	-	++	-

Intensité et stabilité de l'émulsion: -, négatif; + à +++, positif

**TABLEAU 21.** Production de biosurfactants par les souches Thouin dégradant les HAP. Culture en milieu minéral SW avec dextrose (2%). Incubation à 22°C avec agitation à 200 rpm. Présence de biosurfactants évaluée par la formation d'une émulsion entre le sumageant de culture et du kérosène, ainsi que par la diminution de la tension superficielle déterminée par le test DCT et la mesure de la tension.

	Souches													
Observations	6T	6B	6J	18G	19SV	19SJ	19R	28	32S	32R	34	38	46	48
émulsion	+	-	-	++++	+++	++	++++	-	+++	+++	+++	-	++	++
DCT	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+
TS (mN/m)	45	nd	nd	32	nd	nd	nd	nd	nd	nd	37	nd	nd	35

	Souches															
Observations	50	57	59	60	61	62	63	65	67	69	73	76	77	78S	78R	UG2
émulsion	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
DCT	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
TS (mN/m)	nd	nd	48	nd	nd	nd	nd	51	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	32

n.d.: non-déterminé; TS: tension superficielle, DCT : Drop Collapsing Test.

#### 5.4.1. Importance du fer et de l'azote

D'après la littérature, un excès de fer ou d'azote défavorise la production de biosurfactants chez *Ps. aeruginosa*. Ceci a été étudié par l'évaluation de la tension superficielle du surnageant de cultures des souches *Ps. aeruginosa* 32S et 32R dans différents milieux minéraux avec 2% mannitol. Quatre milieux différents ont été utilisés: [1] milieu de sels minéraux SW additionné de 0,01 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (SWF) [2] SWF additionnée de 0,1 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (SWFe+), [3] SWF additionné de 2 g/l de  $\text{NaNO}_3$  (SWFN) et [4] SWF additionnée de 0,1 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et 2 g/l de  $\text{NaNO}_3$  (SWNFe+). Le ratio C:N des milieux avec excès d'azote passait donc de 24,0 à 12,0.

La tension superficielle du surnageant de chaque culture a été évaluée par le DCT (Tableau 22). La concentration de biosurfactants était estimée par des dilutions successives du surnageant (la tension superficielle a été mesurée avec le tensiomètre dans le surnageant dilué 100 fois). On constate une production maximale dans le milieu SWF. Un excès de fer semble donc avoir effet négatif plus important sur la productivité de biosurfactants comparativement à un excès d'azote.

Dans une autre expérience, l'effet de différentes concentrations de fer dans le milieu de culture sur la production de rhamnolipides a été étudié. La souche *Ps. aeruginosa* 19SJ a été cultivée en SW, SWF ou SWFe additionné de 2% mannitol. Dans le milieu non-additionné de fer (SW), la croissance était plus lente mais la concentration finale de rhamnolipides obtenue était supérieure (Figure 19). Dans les cultures avec fer, on peut également observer que l'accumulation de rhamnolipides a débuté à la fin de la phase de croissance exponentielle.

#### 5.4.2. Croissance et production de biosurfactants en présence d'un hydrocarbure aromatique polycyclique

Lors d'un premier essai, les souches 32R, 34 et 57 ont été cultivé dans les milieux BH et SW contenant 2% de mannitol ou de dextrose, ainsi que 100 ppm d'anthracène et de salicylate de

sodium. Comme témoin, les trois souches ont également été cultivées dans le SW avec mannitol (2%) mais sans anthracène.

Le suivi de la tension superficielle par la méthode DCT a démontré que seul le SW avec mannitol favorisait d'une façon tangible la production de biosurfactants (Figure 20). La croissance était nettement plus lente en SW comparativement à celle obtenue en BH. La comparaison avec la culture-témoin en SW avec mannitol sans salicylate et anthracène suggérait que la présence de salicylate et/ou d'anthracène accélère la croissance et la production de biosurfactants.

Lors de l'expérience décrite à la section 4.2.4.3., une production de biosurfactants avait été observée en milieu SW avec mannitol mais pas en BH avec mannitol. En plus, les résultats de l'expérience précédente suggèrent que la croissance et la production de biosurfactants puissent être affectées par la présence d'un HAP. La souche 19SJ a donc été cultivée dans huit milieux différents avec ou sans anthracène: [1] BH enrichi de a) dextrose, b) mannitol, c) dextrose avec 1 ppm EDTA et d) mannitol avec 1 ppm EDTA; [2] SW enrichi de a) dextrose, b) mannitol, c) dextrose avec 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et d) mannitol avec 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Après huit jours d'incubation, toutes les cultures avaient atteint la phase stationnaire (Figure 21), le BH permettant une croissance plus rapide que le SW. La présence d'un HAP ne semble avoir eu aucun effet significatif sur la vitesse de croissance ou la production de biosurfactants, les courbes des cultures avec et sans anthracène étant essentiellement similaires. Le pH et la tension superficielle ont été évalué après douze jours dans chacune des cultures (Tableau 23). On peut observer que les cultures en BH et/ou avec le dextrose ont entraîné une forte baisse du pH. Seules les cultures en SW avec mannitol, en SWF avec dextrose et SWF avec mannitol ont permis une diminution suffisante de la tension superficielle pour que le test DCT soit positif.

#### **5.4.3. Effet de la production de biosurfactants sur la dégradation de l'anthracène**

Une expérience a été effectuée afin de vérifier si la présence d'un substrat spécialement inclus pour la production de biosurfactants allait favoriser la dégradation d'un HAP. Les milieux

décrits lors de l'expérience précédente, additionnés de salicylate et d'anthracène ont été ensemencés avec la souche 19SJ. Une série de fioles servait à suivre la croissance (DO), la production de biosurfactants (DCT et tension superficielle) et le pH, alors que l'autre fut extraite pour évaluer la biodégradation de l'anthracène.

Aucune augmentation significative de la turbidité n'a été notée dans les cultures sans substrat supplémentaire. Seule la culture dans le SWF avec mannitol présentait une coloration verte, signe de la présence de pyocyanine. On peut constater que le dextrose provoque une chute du pH autant dans les milieux BH et SW, alors que le mannitol n'amène une baisse que dans le BH (Tableau 24). Les baisses de tension superficielle suggèrent qu'il y ait eu sécrétion de biosurfactants, quoique pas suffisamment pour rendre le DCT positif. Le dosage de l'anthracène résiduel n'a pas montré de différences de dégradation entre les différents milieux de culture, sauf une faible disparition d'environ 15 à 20 ppm dans quelques-unes des cultures. Ces résultats montrent que la présence d'un substrat facilement assimilable et/ou de biosurfactants n'affectent pas la biodégradation de l'anthracène.

Les cinétiques de croissance et la production de biosurfactants étaient similaires à l'expérience précédente, sauf plus rapides à cause de la température d'incubation plus élevée. Par exemple, la Figure 22 montre l'effet du fer sur la croissance à 23°C ou 30°C. La présence d'un supplément de fer ou une température d'incubation plus élevée favorisaient la croissance de la souche 19SJ en SW.

**TABLEAU 22.** Effet d'un excès de fer et/ou d'azote sur la production de biosurfactants, évalué par la mesure du DCT. Culture des souches productrices de biosurfactants 32S et 32R en SWF supplémenté de fer et/ou d'azote. Incubation à 22°C avec agitation à 200 rpm. La concentration relative de biosurfactants entre les cultures a été estimée avec le DCT en diluant progressivement un échantillon de chaque culture.

Après 191 heures d'incubation

dilution (x)	Souche 32S				Souche 32R			
	SWF	SWFe+	SWN	SWNFe+	SWF	SWFe+	SWFN	SWNFe+
20	++	-	++	++	++	++	++	++
40	++	-	++	+	++	++	++	++
60	++	-	++	+	++	++	++	+
100	+	-	+	-	++	++	++	+
TS finale	55	74	56	62	47	49	50	59

Après 269 heures d'incubation,

dilution (x)	Souche 32S				Souche 32R			
	SWF	SWFe+	SWN	SWNFe+	SWF	SWFe+	SWFN	SWNFe+
100	+	-	+	-	++	++	++	+
150	+	-	-	-	++	+	++	-
200	-	-	-	-	-	-	-	-

TS: tension de surface, exprimée en mN/m;

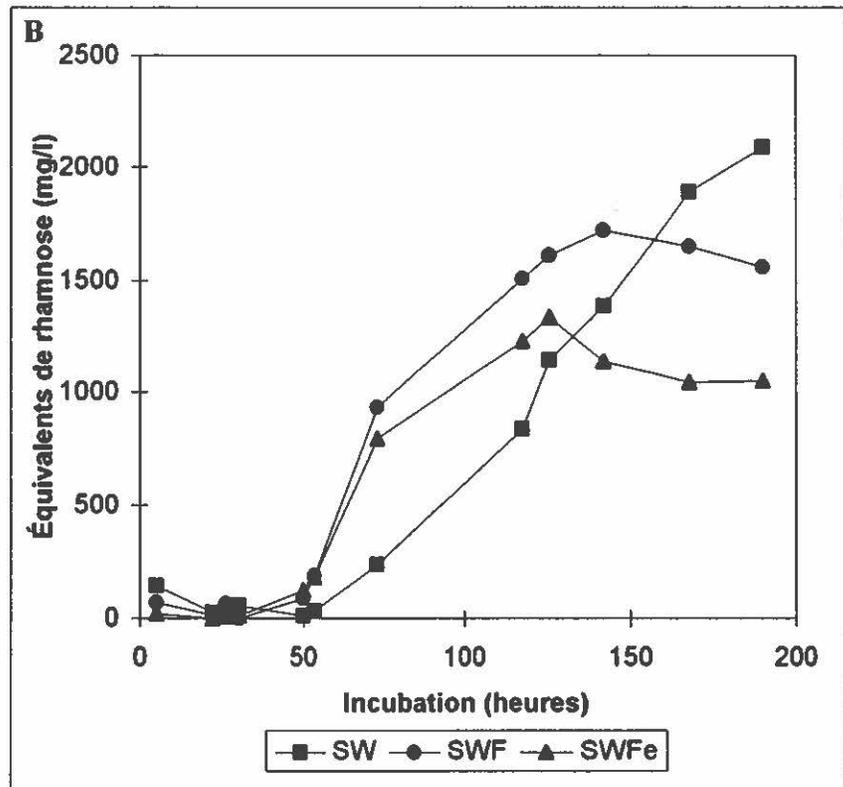
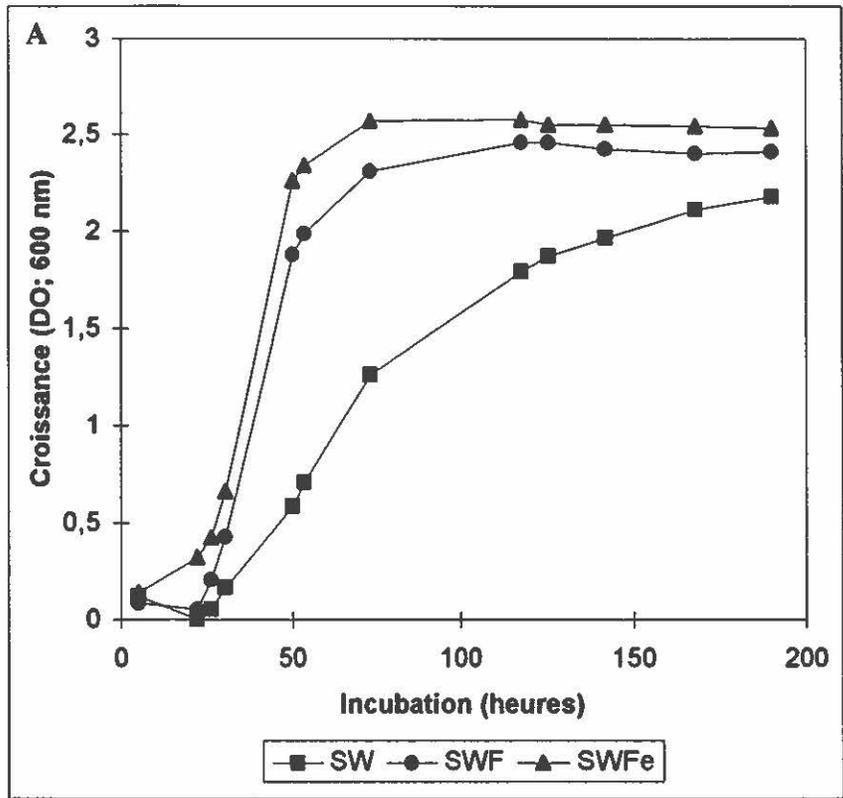
Milieux de cultures: SWF = SW additionné de 0,01 g/l de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (milieu optimal);

SWFe+ = SWF additionnée de 0,1 g/l de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;

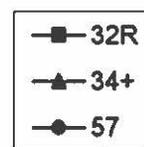
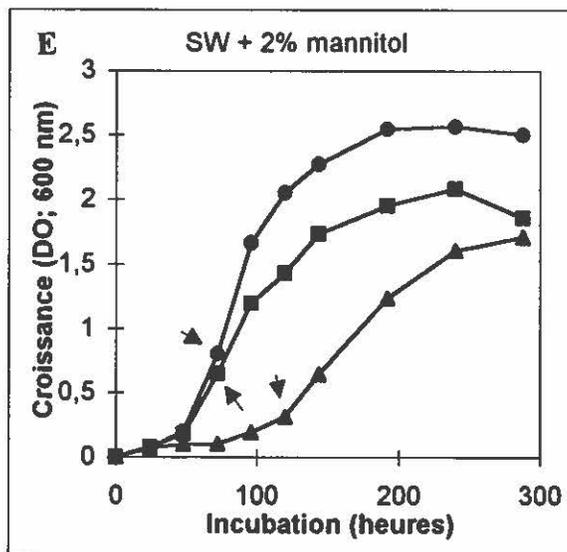
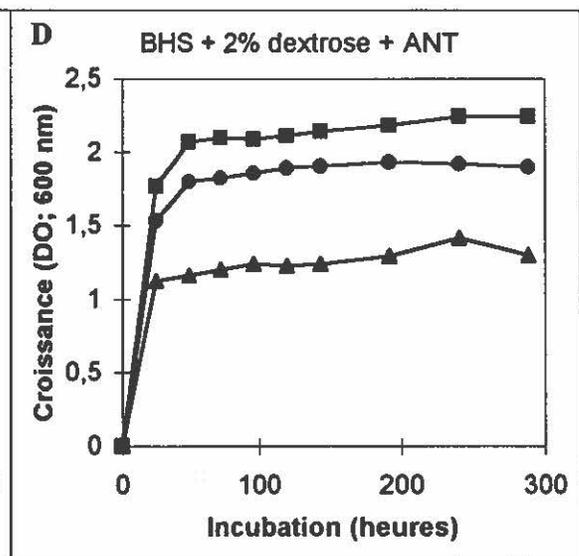
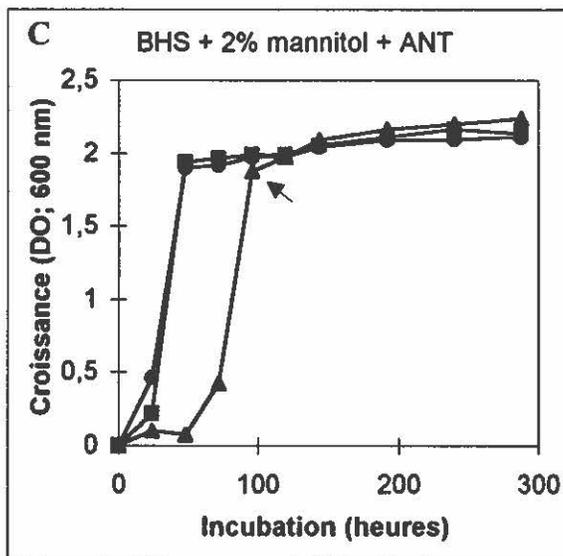
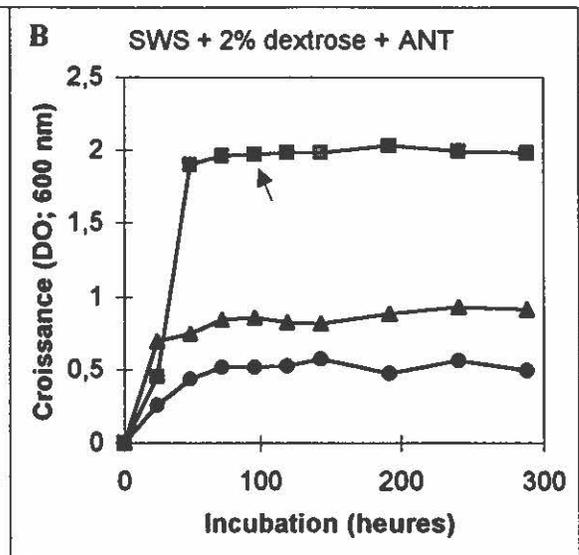
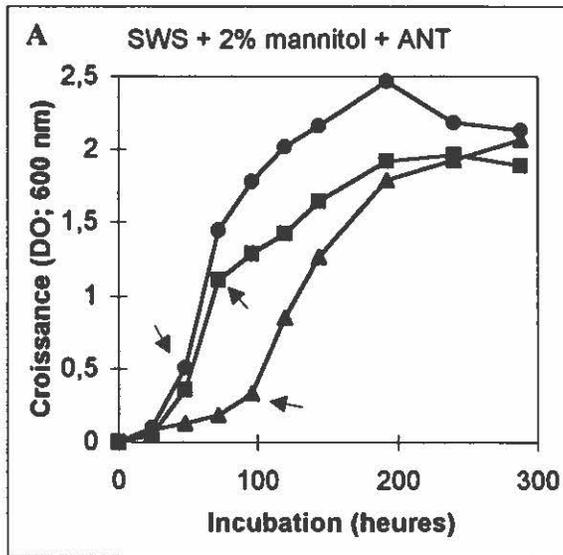
SWFN = SWF additionné de 2g/l de NaNO<sub>3</sub>;

SWNFe+ = SWF additionnée de 0,1 g/l de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O et 2 g/l de NaNO<sub>3</sub>.

**FIGURE 19.** Croissance et production de rhamnolipides par la souche *Ps. aeruginosa* 19SJ cultivée en SW avec différentes concentrations de fer. Incubation à 25°C et 200 rpm. Concentration de rhamnolipides déterminée par la méthode de l'orcinol et exprimée en équivalents de rhamnose. SWF: SW additionné de 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . SWFe: SW additionné de 0,1 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

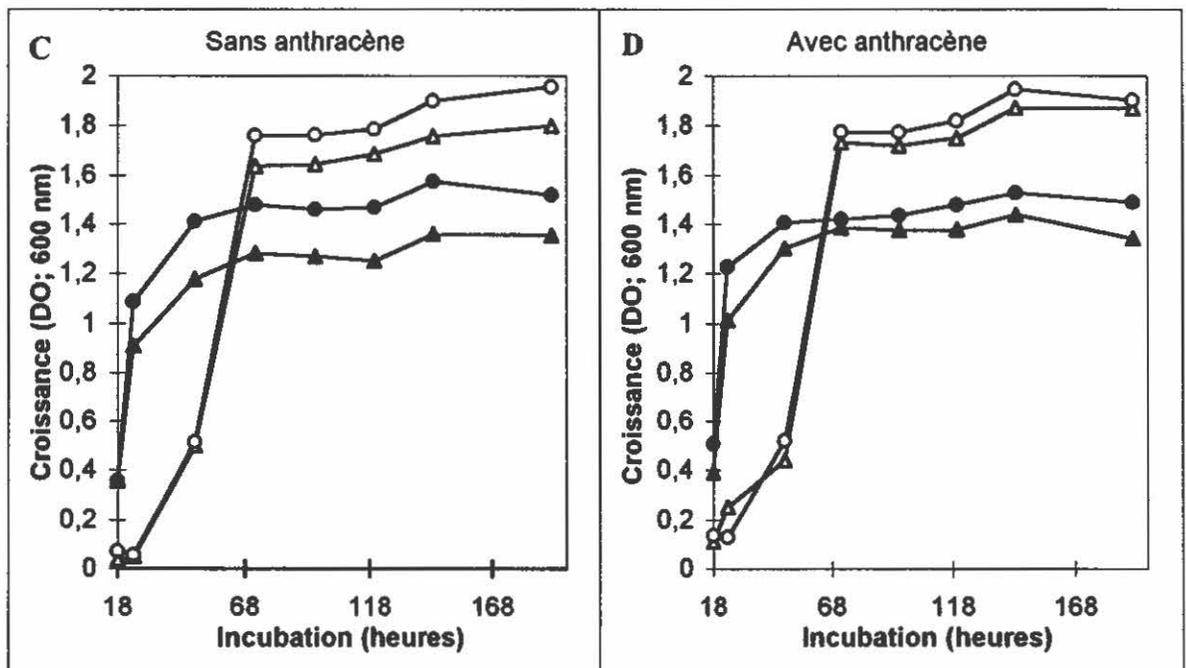
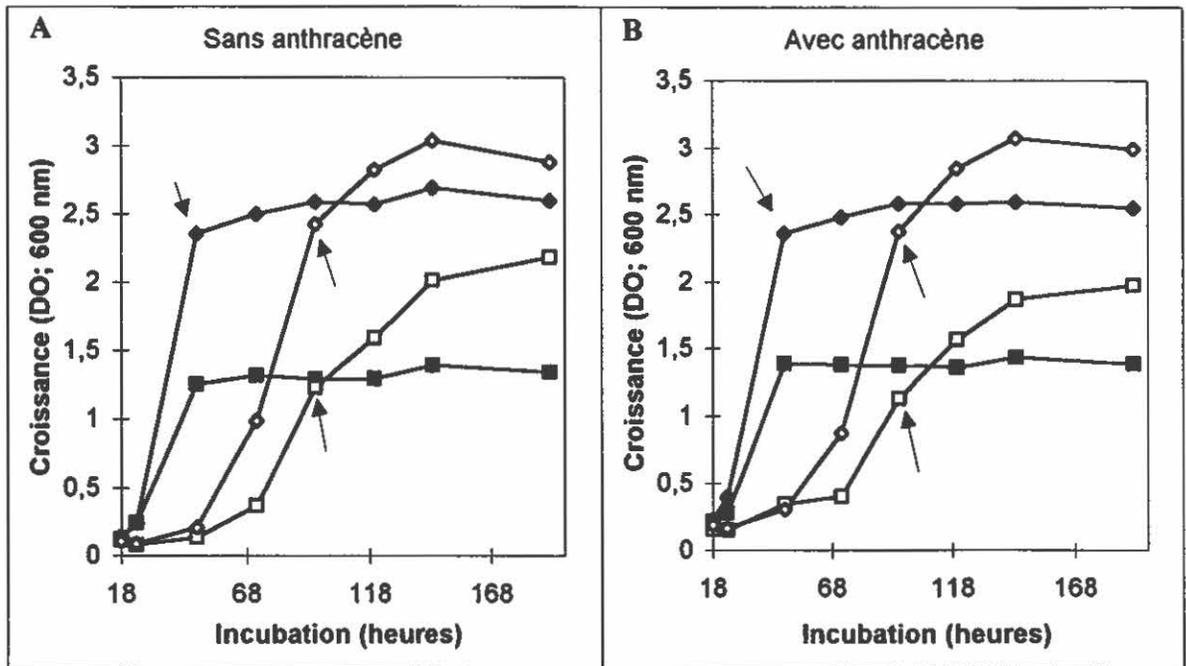


**FIGURE 20.** Croissance et production de biosurfactants en BHS ou SWS avec 2% dextrose ou mannitol et en présence d'anthracène. Incubation à 24°C et 150 rpm. La flèche indique l'échantillon à partir duquel le DCT devenait positif. BHS et SWS: milieu BH et SW avec 100 ppm de salicylate de sodium. ANT: 100 ppm anthracène.



**FIGURE 21.** Comparaison entre des cultures de la souche 19SJ en milieu minéral BH ou SW avec différents enrichissements en présence ou absence de 100 ppm d'anthracène (ANT). Incubation à 24°C avec agitation à 150 rpm. La flèche indique le moment où le test DCT devenait positif (indiquant la baisse de la tension superficielle due à l'accumulation de biosurfactants).

DEX: 2% dextrose. MAN: 2% mannitol. EDTA (1 ppm).



**TABLEAU 23.** Comparaison entre des culture de la souche 19SJ en milieu BH ou SW avec différents enrichissements, en présence ou absence de 100 ppm anthracène. Évaluation du pH (avec papier tournesol) et de la tension superficielle (indication de la présence de biosurfactants) après douze jours d'incubation. Complément à la figure 21.

Milieu de culture	Sans anthracène		Avec anthracène	
	pH final	TS (mN/m)	pH final	TS (mN/m)
BH avec dextrose	4	69	4	69
BH avec mannitol	5	74	5	45
BH avec dextrose et EDTA	4	72	4	72
BH avec mannitol et EDTA	5	48	5	63
SW avec dextrose	4	46	4	48
SW avec mannitol	8	35	8	35
SWF avec dextrose	4	34	4	34
SWF avec mannitol	8	35	8	35

TS: tension de surface; dextrose (DEX) et mannitol (MAN) (2%); EDTA (1 ppm);

**TABLEAU 24.** Analyses ponctuelles de la production de biosurfactants et mesure du pH effectuées sur des échantillons de cultures. Cultures de *Ps. aeruginosa* 19SJ en milieu BH et SW avec 50 ppm salicylate, 200 ppm anthracène et différents suppléments. Incubation à 30°C avec une agitation à 150 rpm. Deux témoins (CONT) sans sucre ont été inclus.

Temps (heures)		BH					SW				
		DEX	DEX EDTA	MAN	MAN EDTA	CONT	DEX	DEX Fer	MAN	MAN Fer	CONT
24	DCT	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
	TS	40	38	54	50	60	40	31	52	60	58
	pH	3,91	4,01	6,70	6,78	7,41	4,54	3,74	7,20	7,27	6,90
30,5	DCT	-	-	+	+	-	-	+++	+	+	-
	TS	40	39	38	40		36	33	51	52	59
	pH	3,82	3,96	5,61	5,62	7,22	4,01	3,72	7,42	8,07	6,92
48	DCT	-	-	+	+	-	-	+++	++++	++++	-
	TS	41	38	39	40		39	33	29	32	nd
	pH	4,01	3,89	5,24	5,24	7,32	4,06	3,70	7,27	7,81	6,93
72	DCT	-	+	+	+	-	-	+++	++++	++++	-
	TS	46	40	38	42	57	45	34	32	33	nd
	pH	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
100	DCT	-	-	+	+	-	-	+++	++++	++++	-
	TS	41	nd	43	nd	nd	39	32	nd	32	nd
	pH	3,64	3,62	4,94	4,68	7,20	3,79	3,48	7,51	8,3	6,90
144	DCT	-	-	++	++	-	-	+++	++++	++++	-
	TS	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	pH	nd	nd	nd	nd	nd	3,83	nd	7,79	8,50	nd

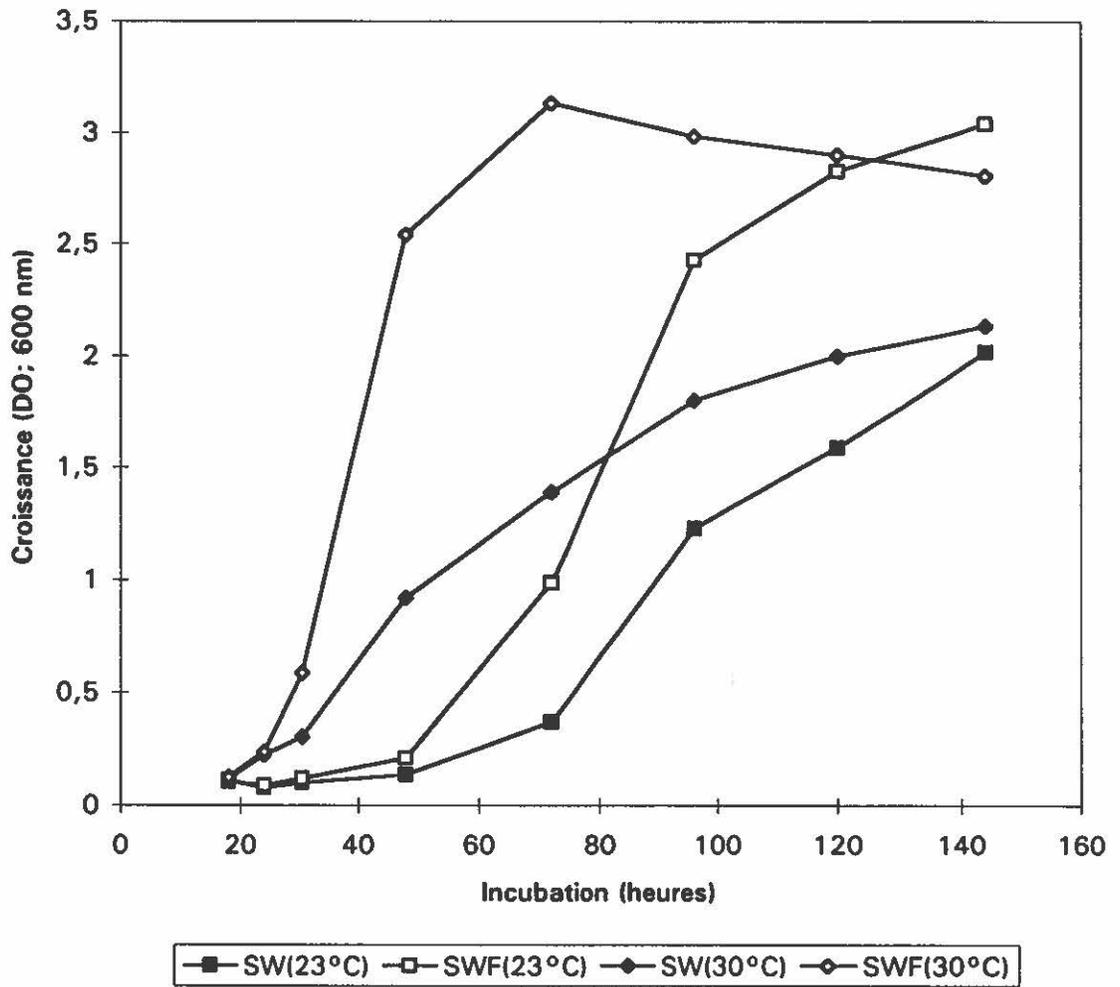
DCT: Drop Collapsing Test , - à ++++; intensité et rapidité de la réponse

TS: Tension de surface du milieu de culture;

DEX ou MAN: 2% dextrose ou mannitol; nd : non déterminé ;

CONT: témoin sans dextrose ou mannitol; EDTA (1 ppm);

**FIGURE 22.** Comparaison de la croissance de la souche *Ps. aeruginosa* 19SJ en milieu de culture SW avec 2% mannitol, 100 ppm anthracène et 100 ppm salicylate. Incubations à 23°C et 30°C. SWF : avec ajout de 0,01 g/l  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . DO : densité optique.



#### 5.4.4. Cinétique de la production de biosurfactants à partir du mannitol

La souche *Ps. aeruginosa* 32R a été cultivée en milieu minéral SW avec 2% mannitol. Des échantillons ont été régulièrement prélevés afin de suivre l'évolution de la croissance (DO à 600 nm), du pH, de la tension superficielle, de la production de rhamnolipides (équivalents de rhamnose) et du potentiel émulsifiant.

Comme attendu, la surproduction de rhamnolipides a débuté à la fin de la phase de croissance exponentielle (Figure 23). Néanmoins, la faible concentration de biosurfactants déjà produite était suffisante pour provoquer dès le départ une baisse importante de la tension superficielle (près de la tension de surface minimale d'environ 30 mN/m). Ceci démontre que les rhamnolipides possèdent une CMC suffisamment basse pour facilement provoquer une diminution rapide (moins de 30 heures) de la tension superficielle. Il est également intéressant de remarquer le pic d'activité d'émulsion juste au début de la surproduction de biosurfactants.

Dans une autre expérience, la production de biosurfactants par les souches 32R et 32S a été comparée en milieu minéral SW supplémenté de 0,01 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (SWF) (Figure 24). Cette faible quantité de fer devrait permettre une meilleure croissance bactérienne et ainsi potentiellement favoriser la production de biosurfactants. Les mêmes conditions d'incubation que l'expérience précédente ont été suivies, et les mêmes paramètres furent analysés, afin de pouvoir également comparer le comportement de la souche 32R dans un milieu de culture avec et sans supplément de fer.

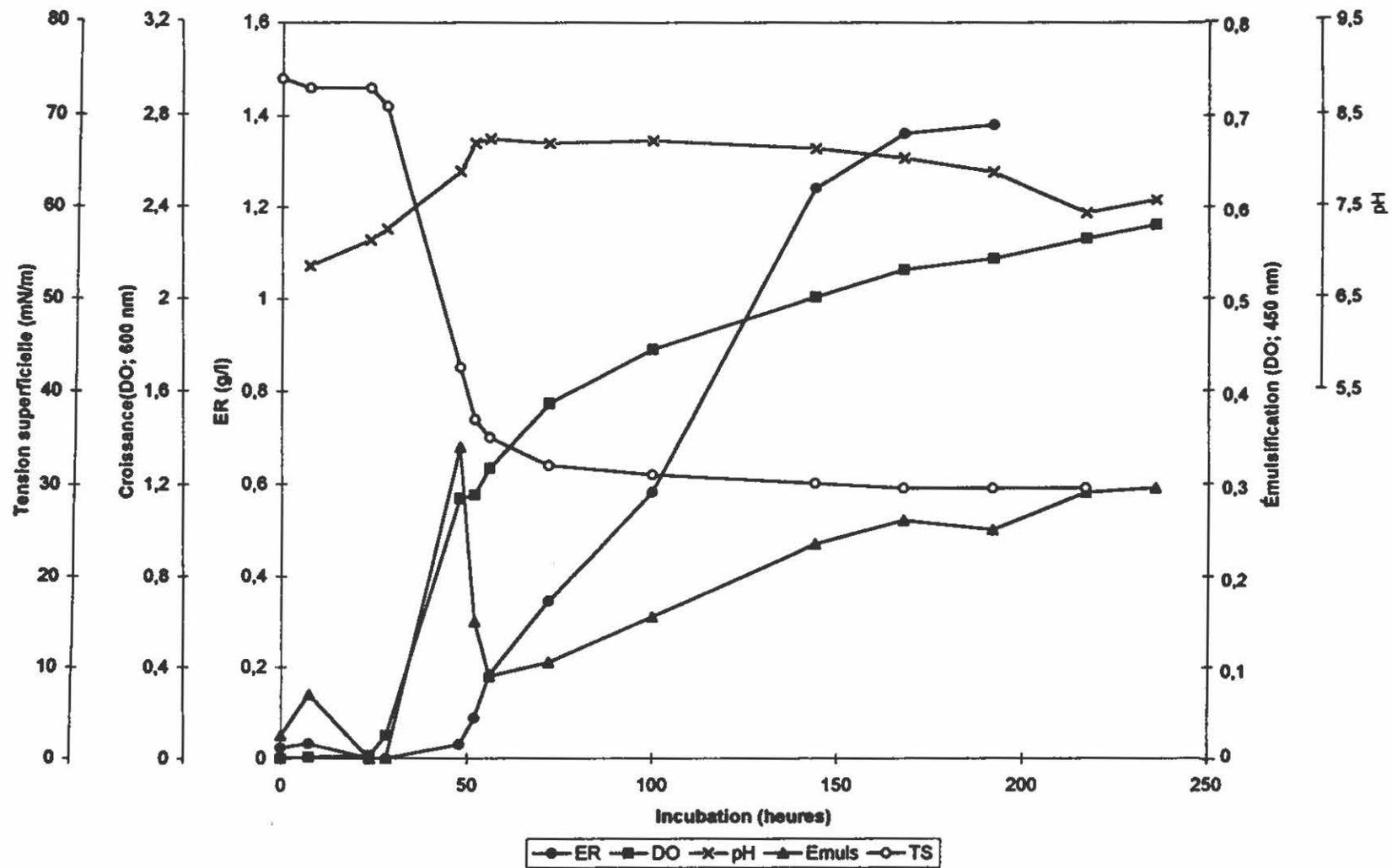
Un pigment vert (la pyocyanine) apparaissait, à partir de la 60e heure, dans le milieu de culture de la souche 32R (Figure 24A). On peut le constater par la différence de la DO du milieu de culture complet et celle corrigée par la soustraction de la DO du surnageant acellulaire. L'apparition coïncidait avec le début de la surproduction de rhamnolipides (32S est apyocyanogène dans les conditions de culture utilisées). Une telle observation a été faite à plusieurs reprises au cours de nos travaux. La figure 24B montre que la production de rhamnolipides par la souche 32S était plus faible que par la souche 32R. Puisque l'activité émulsifiante ne suivait pas l'accumulation des rhamnolipides, le test d'émulsion a été également effectué sur des extraits à l'éther diéthylique

resuspendus dans l'eau distillée. On observe ainsi que le pic d'émulsion est probablement attribuable à un élément comportant une portion lipidique contrairement au reste de l'activité (comparaison entre triangles ouverts et fermés, Figure 24A). Le pic d'émulsion est apparu plus tard que dans la culture sans fer ajouté (comparaison entre les Figures 23 et 24A). La présence de deux pics d'émulsion dans la Figure 24B reste inexpliquée.

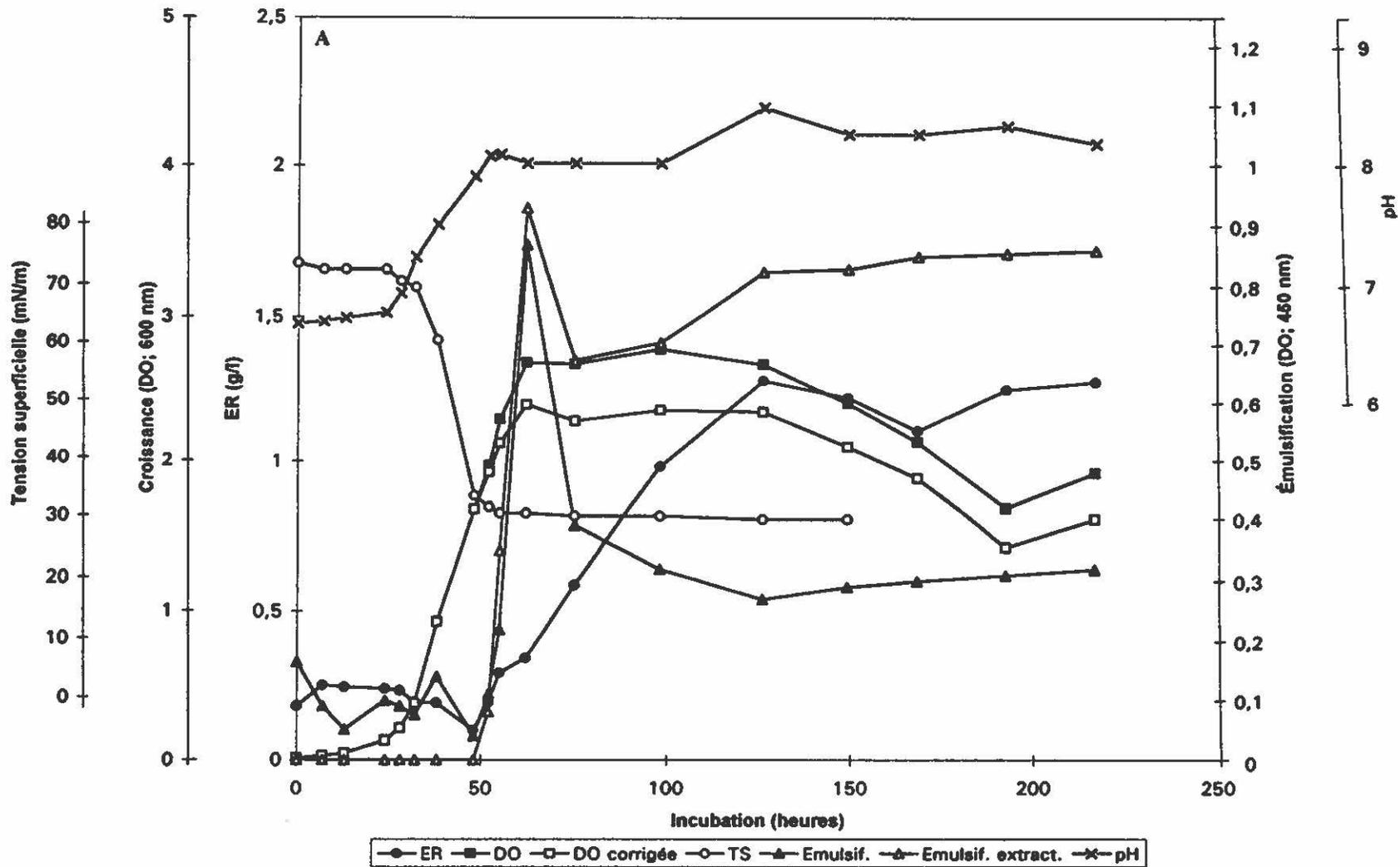
Nos résultats montrent que la présence de fer dans un milieu de culture influence grandement la production de biosurfactants chez *Ps. aeruginosa*. On peut également observer que l'activité émulsifiante ne semble pas dépendre directement de l'accumulation de rhamnolipides dans le milieu de culture, ce qui suggère la présence d'autres facteurs gouvernant le pouvoir émulsionnant.

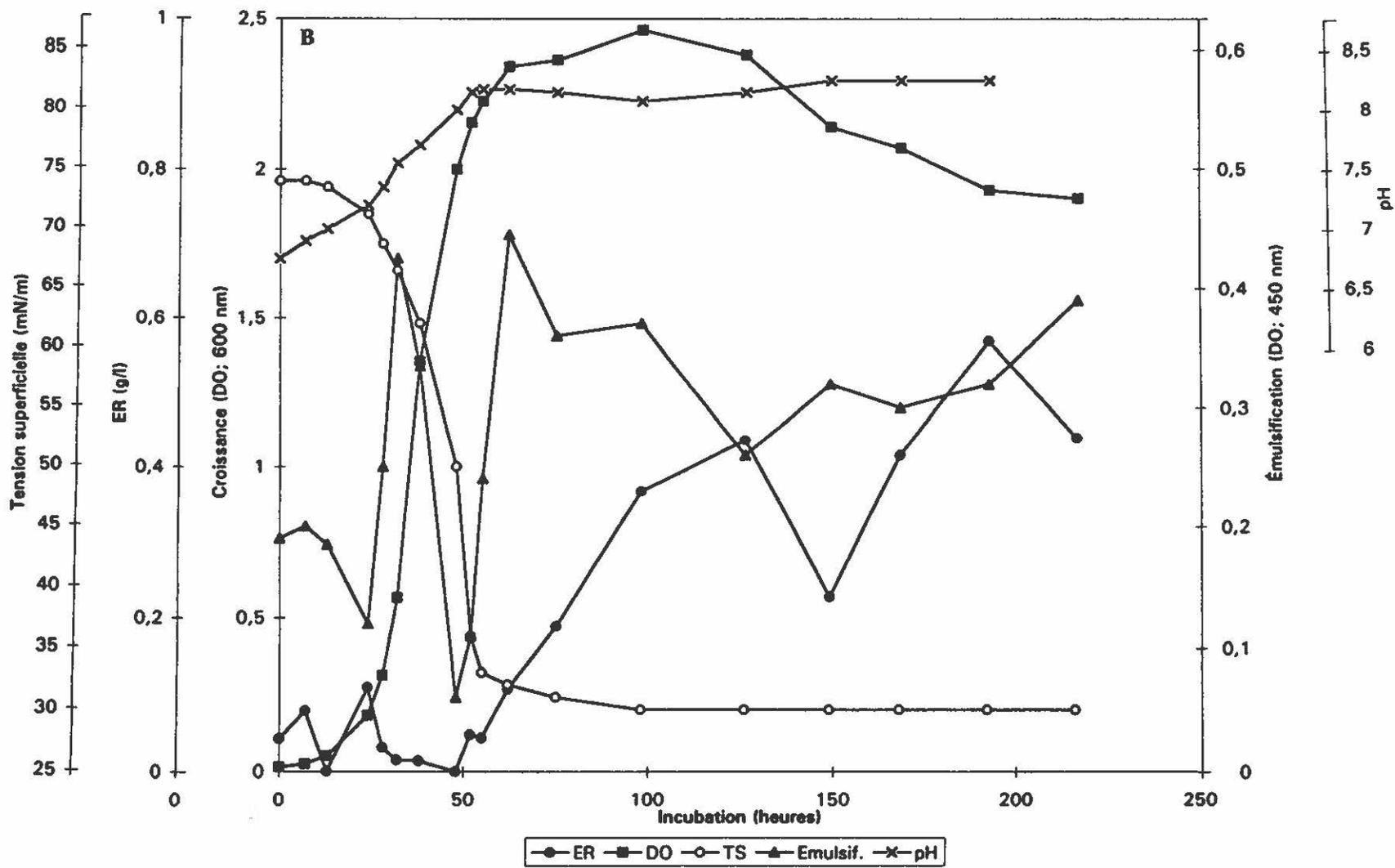
**FIGURE 23.** Production de biosurfactant par *Ps. aeruginosa* 32R cultivé en SW avec 2% mannitol.

Le flacon a été incubé à 24°C avec une agitation de 200 rpm. ER: concentration de rhamnolipides (biosurfactants) exprimée en équivalents de rhamnose. TS: tension superficielle. Emuls: activité émulsifiante. DO: densité optique.



**FIGURE 24.** Production de biosurfactant par *Ps. aeruginosa* 32R [A] et 32S [B] cultivés dans le milieu minéral SW avec 2% mannitol. Les flacons ont été incubés à 24°C avec une agitation de 200 rpm. ER: concentration de rhamnolipides exprimée en équivalents de rhamnose. TS: tension superficielle. DO corrigée: densité optique de la culture corrigée par la soustraction de la DO du sumageant. Emuls: activité émulsifiante du milieu de culture. Emuls. extract.: activité émulsifiante d'un extrait à l'éther d'un échantillon équivalent de culture.





### **5.5. Étude de la capacité à produire des biosurfactants à partir d'un HAP comme substrat**

Lors de l'étude de la biodégradation des HAP par les souches Thouin, des problèmes d'émulsion ont parfois affecté l'extraction des résidus d'hydrocarbures pour les analyses au GC-FID. Les biosurfactants possédant une certaine activité émulsifiante, il y avait une possibilité que cette observation leur soit attribuable. Cependant, aucune diminution significative de la tension superficielle ne put être mesurée dans ces cultures.

#### **5.5.1. Essai en SW avec naphthalène**

Des tubes à essai contenant du milieu minéral SW et 2% de naphthalène furent ensemencés avec les treize souches de *Pseudomonas* productrices de biosurfactants et la souche de référence UG2.

Après deux semaines d'incubation, la croissance a été évaluée visuellement (turbidité) et la production de biosurfactants par la formation de mousse et le DCT (Tableau 25). Les milieux de cultures étaient fortement pigmentés vert (pyocyanine) et brun (produit de la dégradation du naphthalène). Il semble y avoir une corrélation entre la production de biosurfactants et de pyocyanine.

#### **5.5.2. Production de biosurfactants avec le naphthalène: étude préliminaire de la cinétique**

La production de biosurfactants par les souches 19SJ et 34 dans les milieux SW et SWF a été comparée par des cultures avec 2% de naphthalène. Après une semaine d'incubation à 22°C, les cultures devenaient brune-rouge foncée et une épaisse mousse se formait lorsque la culture était agitée. Le test d'émulsion et le DCT était positif dans les deux milieux, quoique la production a semblé supérieure dans le SWF.

La cinétique d'accumulation des rhamnolipides lors de la croissance sur le naphthalène a été évaluée. Un flacon contenant du SWF et 1% de naphthalène fut ensemencé avec quelques ml de culture de la souche 34 en SWF. Après 140 heures d'incubation, du naphthalène (1%) a été

rajouté car il ne semblait plus en rester (absence de cristaux et d'odeur). L'accumulation de rhamnolipides qui apparaissait stabilisée reprit (Figure 25). Après cinq jours, le milieu de culture était brun foncé. Proportionnellement peu de rhamnolipides ont été produit comparativement à une culture avec mannitol.

### **5.5.3. Production de biosurfactants avec le phénanthrène comme seul substrat**

Une tentative a été effectuée afin de déterminer si un HAP moins soluble que le naphthalène pouvait aussi servir de substrat pour la production de biosurfactants. Des flacons contenant du SWF et 2% phénanthrène ont étéensemencés avec un ml de culture de dix jours de 19SJ et 34 dans SWF avec 2% naphthalène (voir 5.5.2.). Les inocula contenaient donc des cellules potentiellement déjà adaptées à la production de biosurfactants sur un HAP, ainsi qu'une faible quantité de biosurfactants. Après dix jours, une bonne croissance était évidente et de la mousse recouvrait les cultures. Le DCT et le test d'émulsion indiquaient que du biosurfactant était présent dans le milieu de culture.

### **5.5.4. Recherche d'activités tensioactives ou émulsifiantes par les isolats BDP**

Afin de déterminer si des isolats BDP pourraient éventuellement produire du biosurfactant à partir de HAP, certains furent cultivés dans les milieux BH et BHYS avec 100 ppm chacun de fluorène, phénanthrène et fluoranthène. Après deux semaines d'incubation les surnageants de cultures ont été testés pour la présence d'une activité émulsifiante avec du benzène plutôt que de l'hexadécane (comme en 5.3.6.). Le test destiné à détecter un pouvoir émulsifiant est plus sensible que les techniques permettant de constater une diminution de la tension superficielle. Alors qu'un potentiel de stabilisation d'émulsion a été constaté (Tableau 26), l'étude de la tension superficielle des surnageants des cultures de 105 et 107 n'indiquait pas de diminution significative. Ceci signifie que seul un bioémulsifiant était produit, comme lors de l'expérience avec le dextrose (Tableau 20).

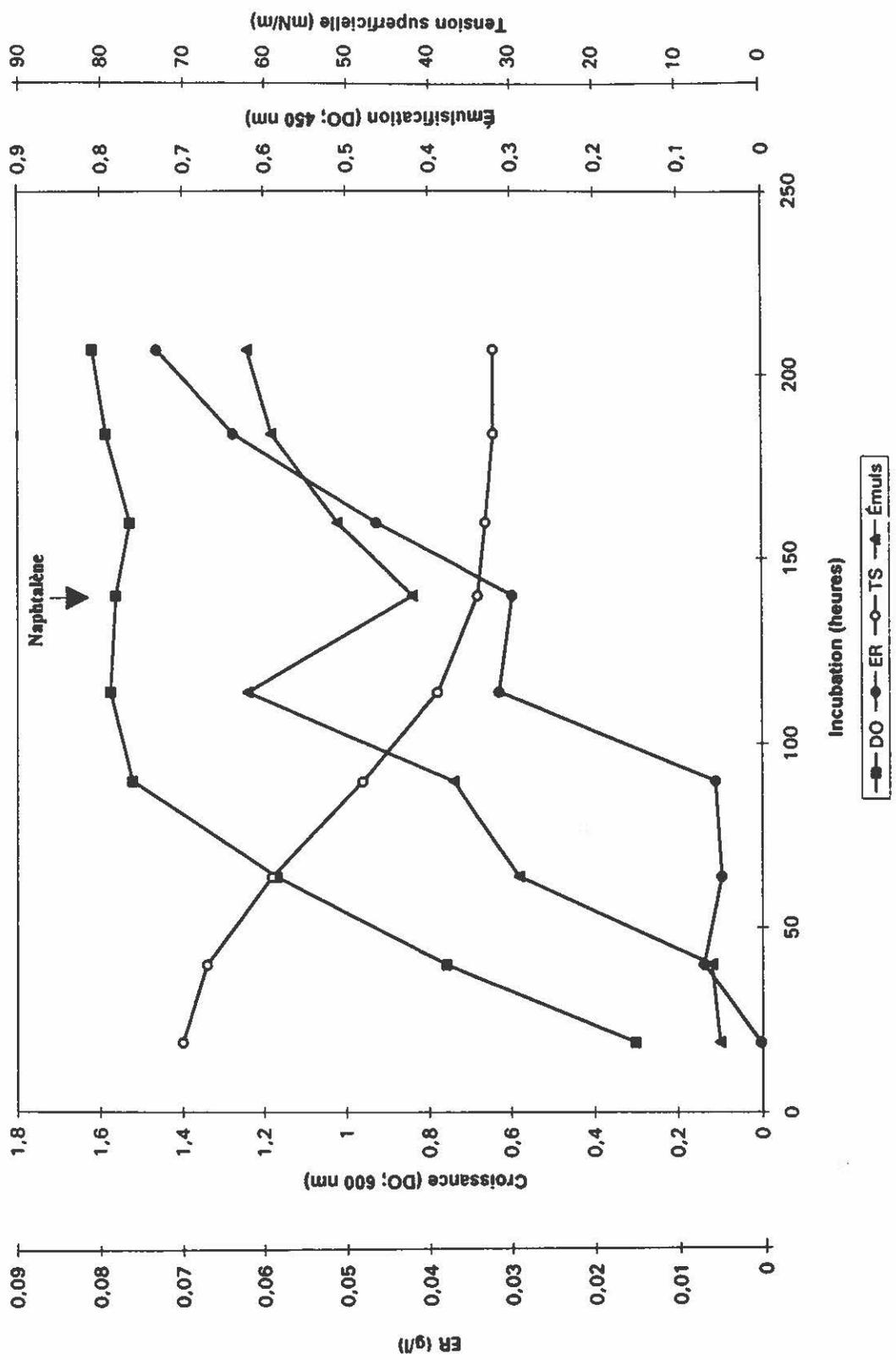
La présence d'un émulsifiant extracellulaire a été confirmée en répétant le test d'émulsion avec un filtrat acellulaire.

**TABLEAU 25.** Croissance et production de biosurfactants avec le naphthalène comme substrat. Les souches de *Pseudomonas* isolées de la Sablière Thouin productrices de biosurfactants sur les substrats solubles (dextrose, mannitol), ainsi que la souche de référence UG2 ont été testées. Les tubes à essai contenant 10 ml de milieu minéral SW furent incubés à 30°C avec une agitation de 150 rpm. Croissance et production de biosurfactants évaluées après deux semaines d'incubation.

	Souches													
	18G	19R	19SV	19SJ	32S	32R	34	46	48	50	57	78R	78S	UG2
Croissance	++	+++	++	++	++	++	++	-	-	-	++	++	+	-
DCT	+	++++	+++	+++	+	+++	+	nd	nd	nd	++	++	+	nd

DCT: présence de biosurfactants évaluée par le "Drop Collapsing Test";  
 Croissance: négative (-) à maximale (+++);  
 nd: non-déterminé car aucune croissance.

**FIGURE 25.** Production de biosurfactants par *Ps. putida* 34 cultivé en milieu minéral SWF avec 1% de naphthalène. La culture était incubée à 24°C avec une agitation de 150 rpm. ER: concentration de rhamnolipides exprimée en équivalents de rhamnose. TS: tension superficielle. La flèche indique le moment où la deuxième dose de naphthalène (1%) a été rajouté.



**TABLEAU 26.** Activité émulsifiante de quelques souches et isolats BDP cultivés en BH et BHYS avec des 100 ppm chacun de fluorène, phénanthrène et fluoranthène. Test d'émulsion effectué après deux semaines d'incubation à 24°C et 150 rpm.

	Souches												
	91	99	100	101	103	105	107	110	112	113	114	115	116
BH	++	++	++	++	++	+++	+	-	+	-	-	+	+
BHYS	++	++	+	++	++	++	+++	-	+	+	+	+	+

Intensité et stabilité de l'émulsion: - (nulle) à +++ (max.);

## **5.6. Production de biosurfactants vs zones d'éclaircissements sur géloses pulvérisées avec HAP**

Des tests ont été effectués afin de vérifier si la production de biosurfactants pourrait être responsable des zones observées sur les géloses recouvertes de HAP avec la méthode par pulvérisation.

### **5.6.1. Géloses BH avec 2% dextrose**

Des souches productrices de biosurfactants en BH avec 2% dextrose (19R, 46, 48, 50, UG2 et PG201) ont étéensemencées sur des géloses préparées avec ce même milieu de culture puis recouvertes de naphthalène, acénaphthylène, fluorène, phénanthrène, anthracène ou pyrène. Seule la souche dégradant les HAP (19R) produisit une zone d'éclaircissement. Ce résultat suggère que, si effectivement du biosurfactant fût sécrété, il n'a pas formé de zones par solubilisation des HAP autour des colonies.

Lors de l'expérience précédente, il n'y avait pas de certitude que les bactéries aient sécrété des biosurfactants. Des gouttes (20  $\mu$ l) de surnageant de culture contenant une forte concentration de biosurfactants ont été déposées à la surface ainsi que dans des puits creusés dans une gélose BH recouverte de phénanthrène. L'ajout de biosurfactants n'a pas provoqué de zones d'éclaircissements dans le film de phénanthrène.

### **5.6.2. Pulvérisation de phénanthrène sur géloses bleues SW**

Du phénanthrène a été pulvérisé sur des géloses bleues SW contenant 100 ppm salicylate et 2% mannitol afin de comparer la zone de dégradation des HAP à l'auréole de précipitation des rhamnolipides. Les géloses furentensemencées avec les souches capables de dégrader le phénanthrène et de produire du biosurfactant avec le mannitol (18G, 19R, 19SJ, 19SV, 32S, 32R, 34, 57, 78S et 78R). Comme témoins, des souches produisant du biosurfactant mais ne dégradant

pas les HAP (46, 48, 50 et UG2), ainsi que des souches dégradant les HAP mais ne produisant pas de biosurfactant (28, 38, 59, 60, 61, 62, 63, 65, 67,69, 73, 76, 77) furent également inoculées. Une série équivalente mais non recouverte de phénanthrène fut aussi préparée. Les géloses ont été incubées à 29°C pendant 5 jours.

Ce test a permis de confirmer que les zones d'éclaircissement sur des géloses recouvertes de phénanthrène ne sont pas liées à la production de biosurfactants. La manifestation des deux activités était nettement distincte.

## **6. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS AVEC LE NAPHTALÈNE COMME SUBSTRAT**

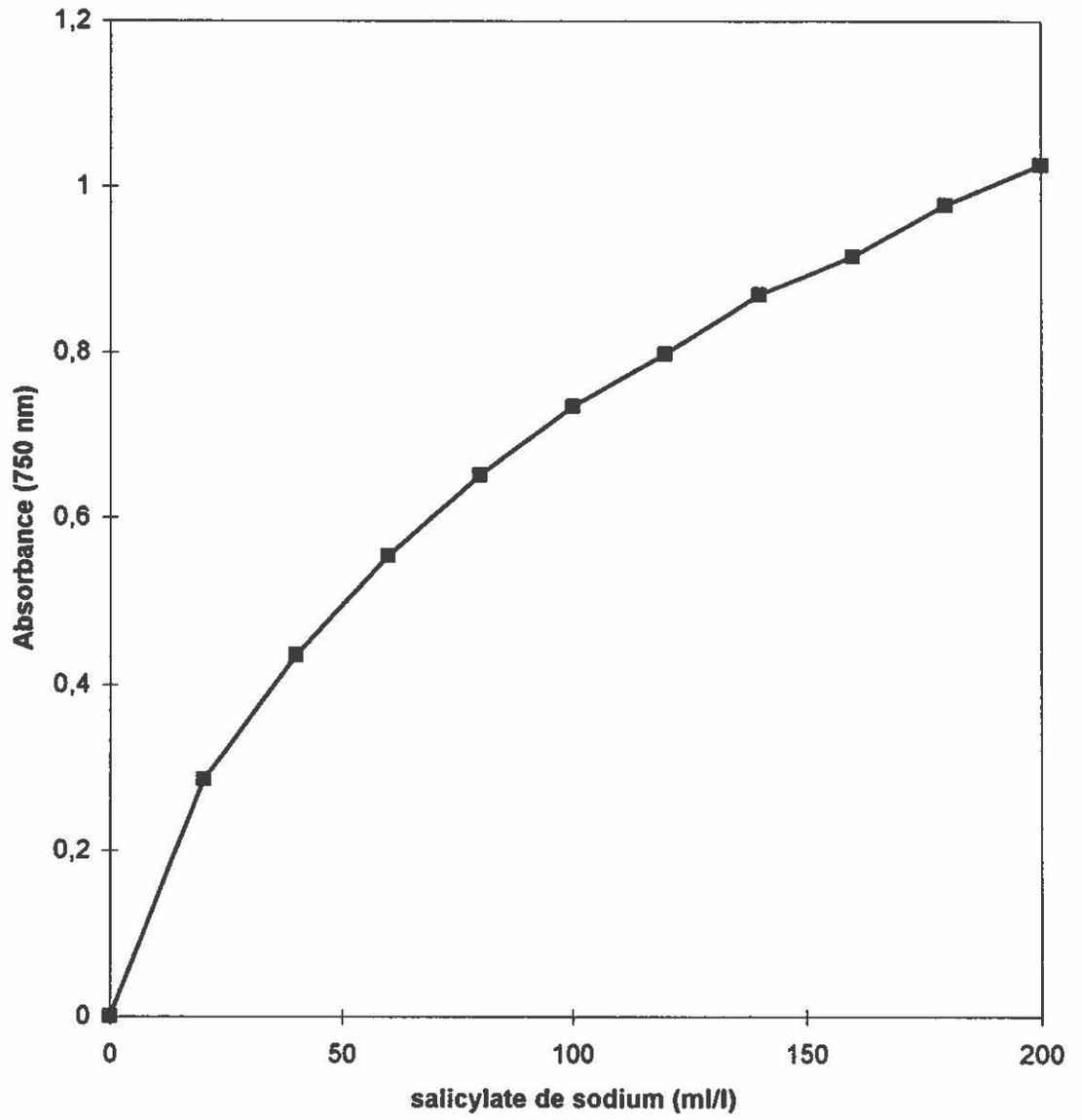
À cause de son aspect original, la cinétique de croissance et de production de rhamnolipides lors de l'utilisation du naphthalène a fait l'objet d'une analyse plus détaillée. La souche *Ps. aeruginosa* 19SJ a été employée.

### **6.1. Mise au point des techniques d'analyse**

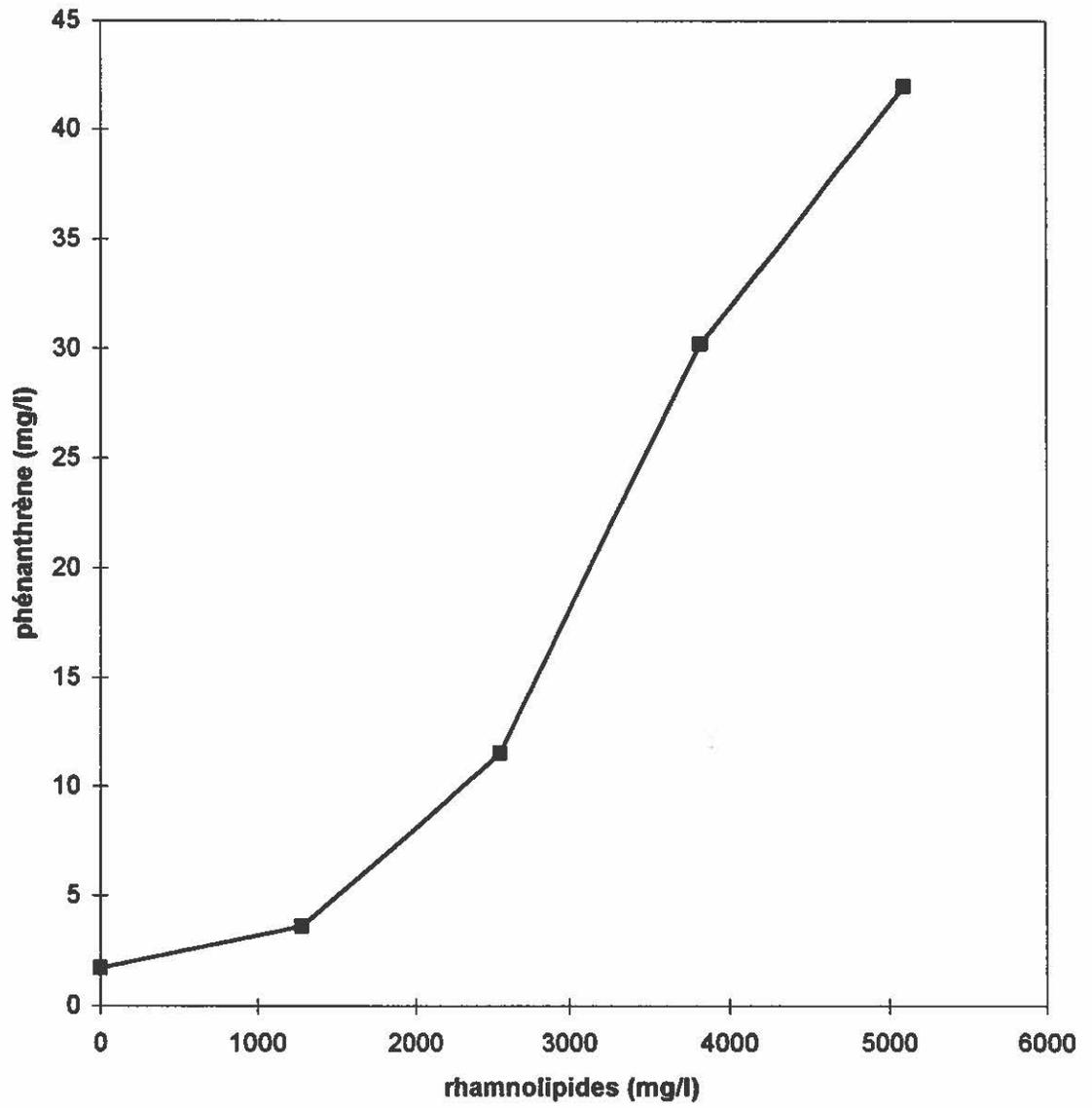
L'accumulation d'intermédiaires de la dégradation du naphthalène a été estimée par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. La concentration de composés aromatiques polaires hydroxylés était évaluée à l'aide d'une courbe étalon préparée avec du salicylate de sodium (Figure 26). L'évaluation de la dégradation du naphthalène posait un problème car c'est un substrat volatil et il était ajouté à une concentration très élevée (20 g/l). L'analyse de la concentration de métabolites de dégradation permettait donc d'estimer l'utilisation de ce substrat.

La production de biosurfactants devrait augmenter la solubilité apparente du naphthalène. La méthode développée pour estimer la concentration aqueuse d'un HAP a premièrement été évaluée avec des solutions de biosurfactants contenant un excès de phénanthrène. La figure 27 montre que la solubilité apparente du phénanthrène s'accroît avec la concentration de rhamnolipides dans la suspension.

**FIGURE 26.** Courbe étalon du salicylate de sodium vs absorbance à 750 nm. Utilisée pour la méthode d'évaluation de la concentration de substances aromatiques hydroxylées avec le réactif de Folin-Ciocalteu.



**FIGURE 27.** Accroissement de la solubilité apparente initiale du phénanthrène en fonction de la concentration de rhamnolipides (biosurfactants). La solubilité aqueuse du phénanthrène se situe autour de 1,3 mg/l à 25°C (Tableau 1). Démonstration du pouvoir solubilisant des rhamnolipides produits par *Ps. aeruginosa*.



## **6.2. Influence de la concentration en fer**

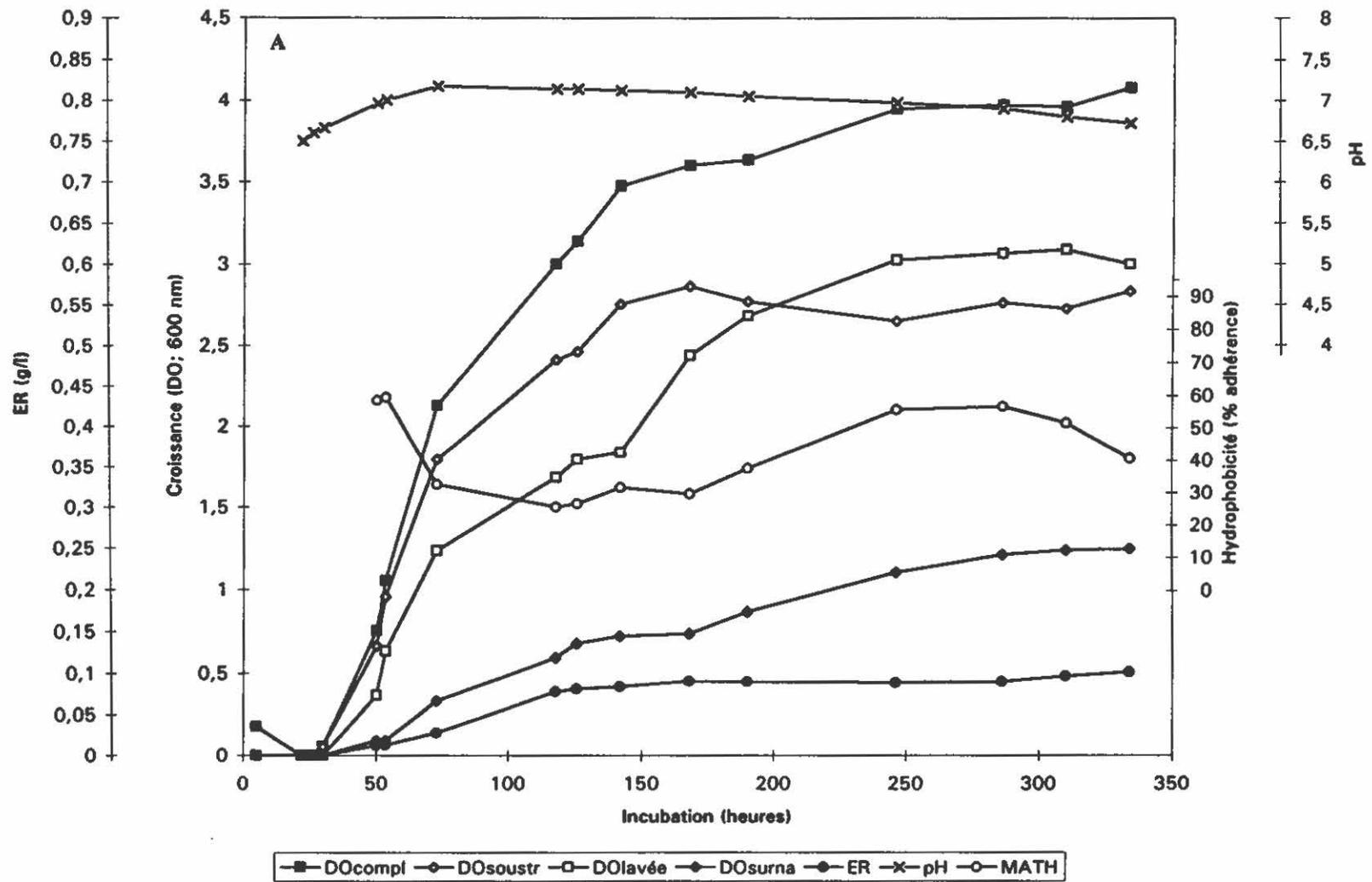
L'effet de différentes concentrations de fer dans le milieu de culture sur la production de rhamnolipides a été comparé. Des flacons contenant du milieu minéral SW, SWF ou SWFe et 2% naphthalène ont étéensemencés avec des cellules lavées récoltées d'une culture en SWF avec naphthalène (voir 5.5.2.). Ces paramètres ont été suivis: la croissance, la concentration de rhamnolipides, l'hydrophobicité de la membrane cellulaire par le test MATH, et le pH. L'hydrophobicité de la surface des bactéries pourraient fournir de l'information sur le potentiel d'adhésivité des cellules aux substrats insolubles. Après 190 heures, la température d'incubation fut haussée à 28°C.

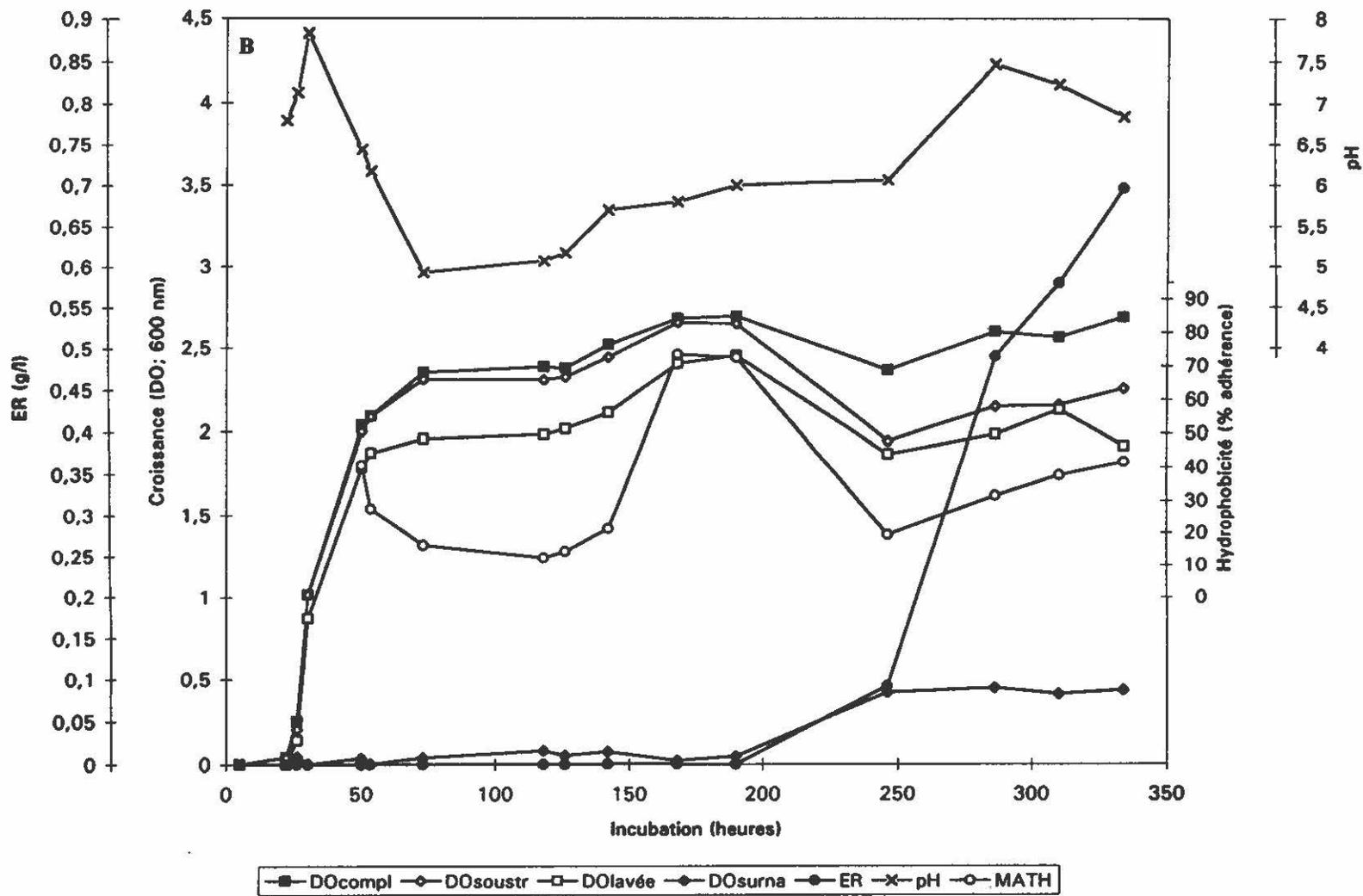
La culture dans le SW (Figure 28A) était très colorée (rouge). Le sumageant devenait de plus en plus foncé et lors de la centrifugation d'un échantillon de culture, un culot rouge-noir s'accumulait. Il était néanmoins difficile d'évaluer si ce dépôt était formé de cellules pigmentées ou de particules recouvrant les cellules. À cause de cette coloration, la croissance bactérienne a été évaluée de trois façons différentes: [1] DO de la culture complète, [2] DO corrigée par soustraction de la DO du sumageant, et [3] DO des cellules lavées. Le DCT est devenu positif et de la mousse est apparue dès la 70e heure d'incubation.

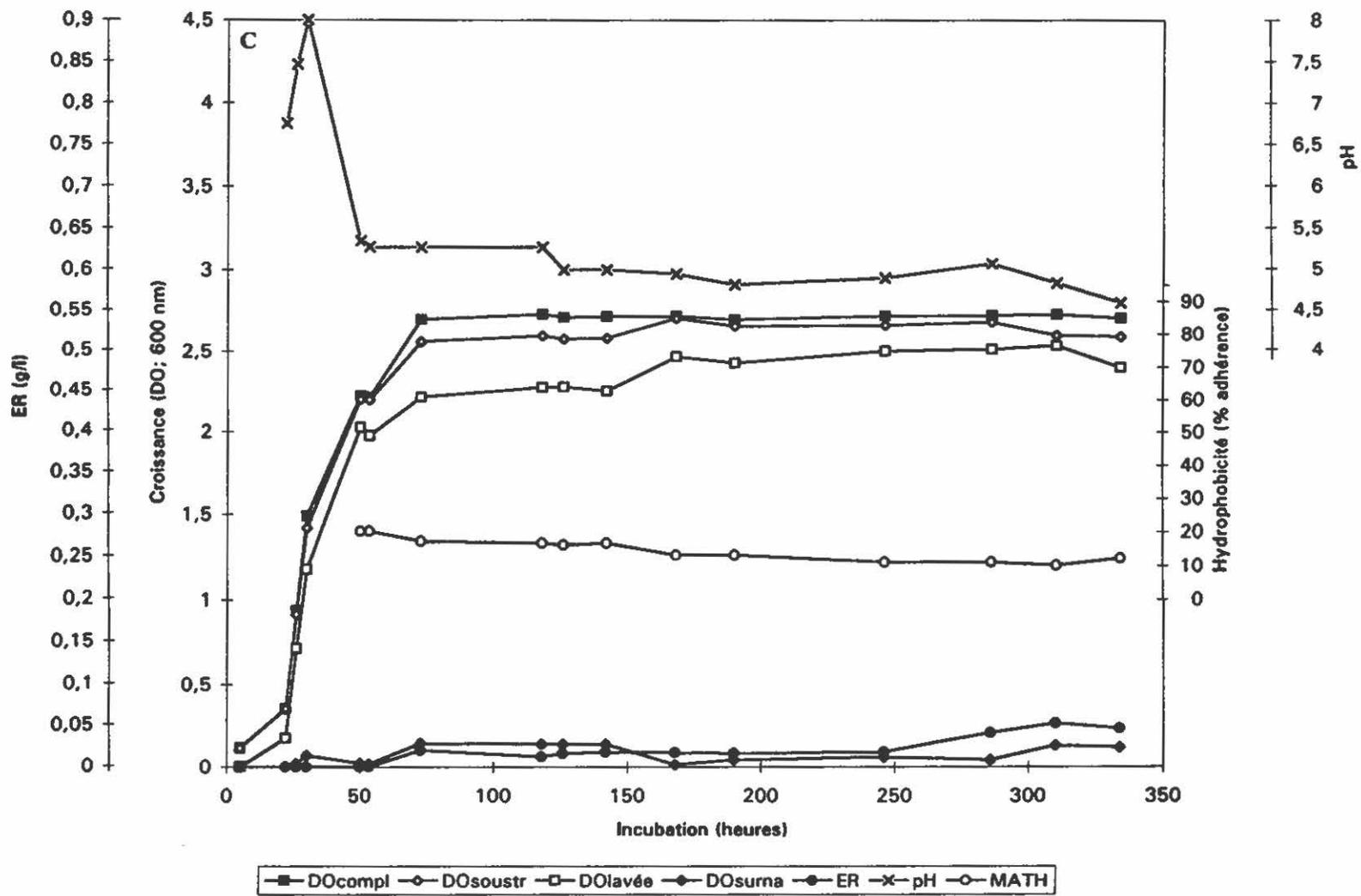
La coloration rouge de la culture dans le SWF était moins intense mais les cellules avaient nettement une couleur rouge foncée. Puis, après la hausse de température, les cellules sont devenues blanches et le sumageant très rouge-brun. Cette transition a coïncidé avec le début de l'accumulation de rhamnolipides dans le milieu de culture et la chute importante de l'hydrophobicité cellulaire (Figure 28B).

La culture dans le SWFe était légèrement rougeâtre. En contraste avec le pH de la culture SW qui était resté près de la neutralité et celui de la culture SWF qui était remonté après la baisse autour de 5, celui de la culture SWFe s'est maintenu entre 4,5 et 5 dès le début de la phase stationnaire (Figure 28C). Aucune diminution de la tension superficielle ou accumulation significative de rhamnolipides n'a été détectée. Le résultat de ces trois cultures illustre l'importance du fer dans la production des rhamnolipides.

**FIGURE 28.** Croissance et production de biosurfactants par *Ps. aeruginosa* 19SJ cultivé en milieux minéraux SW [A], SWF [B] et SWFe [C] avec 2% naphthalène. Incubation à 25°C et 200 rpm. DOcompl: densité optique de la culture complète. DOSoustr: soustraction de la DO du surageant. DOlavée: DO des cellules lavées resuspendues dans. DOSurna: DO du surageant. ER: concentration de rhamnolipides (biosurfactants) exprimées en équivalents de rhamnose. MATH: test d'hydrophobicité de la paroi cellulaire, exprimé en pourcentage d'adhérence à une phase liquide hydrophobe (hexadécane).







### **6.3. Effet de la composition de l'inoculum: cellules lavées ou culture complète**

Deux nouvelles cultures de 19SJ en SWF avec 2% naphthalène ont été effectuées. Un flacon futensemencé avec 5 ml de la culture dans SWF précédente (6.2.) et l'autre avec la même quantité de cellules mais lavées dans du SWF. La culture inoculée avec la culture complète reçut donc simultanément une certaine quantité de biosurfactants, de métabolites de la dégradation du naphthalène etc.

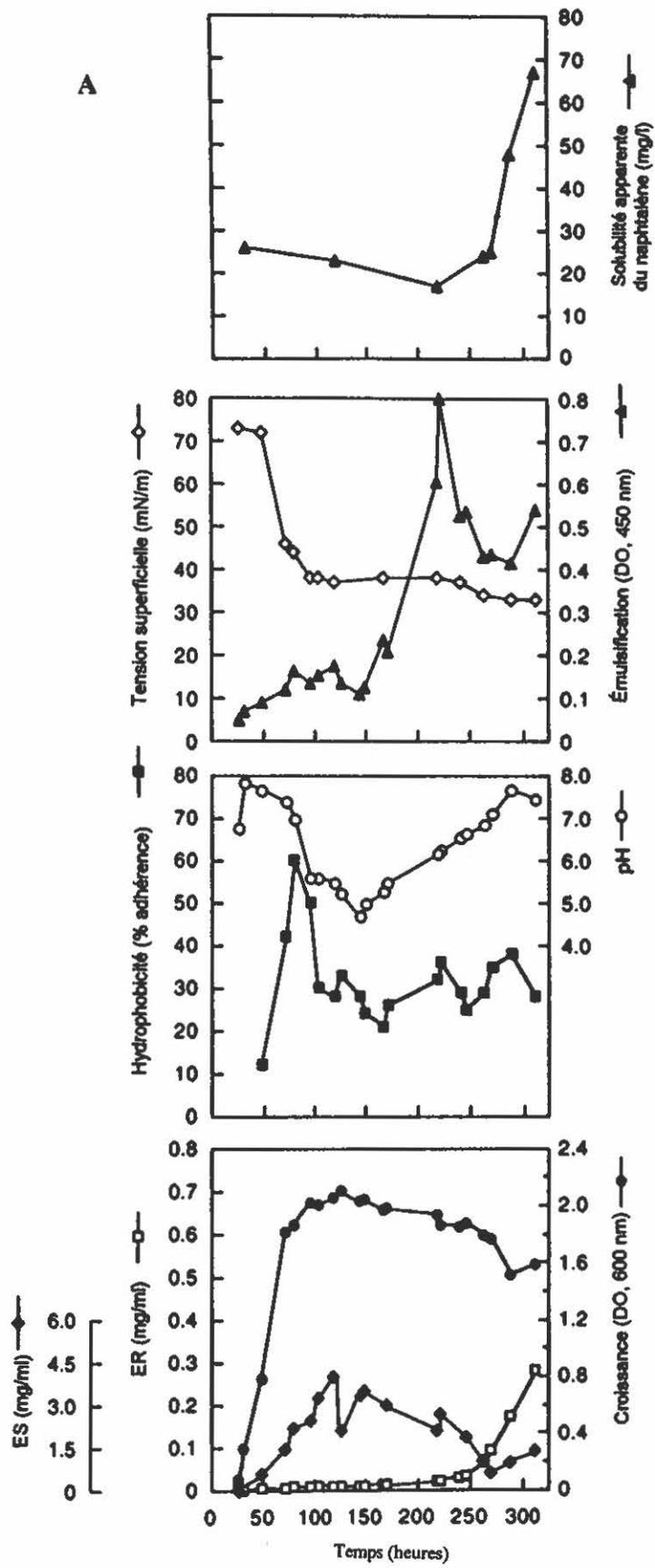
Une quantité importante de cristaux sous forme d'aiguille était observée dans les tubes lors des extractions à l'éther pour le dosage des rhamnolipides. L'apparition de ces cristaux semblait correspondre à l'accumulation de substances aromatiques hydroxylées. Ces cristaux ont été analysés par chromatographie (GC-MS) et identifiés comme de l'acide salicylique, le produit de l'opéron supérieur de la voie catabolique du naphthalène (Figure 3). Ceci est en accord avec la diminution du pH observée.

La production de rhamnolipides semble s'être effectuée en deux phases dans chaque culture. On peut constater un ralentissement dans l'accumulation des rhamnoses entre la 100e et 150e heure d'incubation dans la culture inoculée avec du milieu complet, et entre la 70e et la 170e heure dans la cultureensemencée avec des cellules lavées. Dans cette dernière, la production de biosurfactants au début était néanmoins suffisante pour abaisser la tension superficielle.

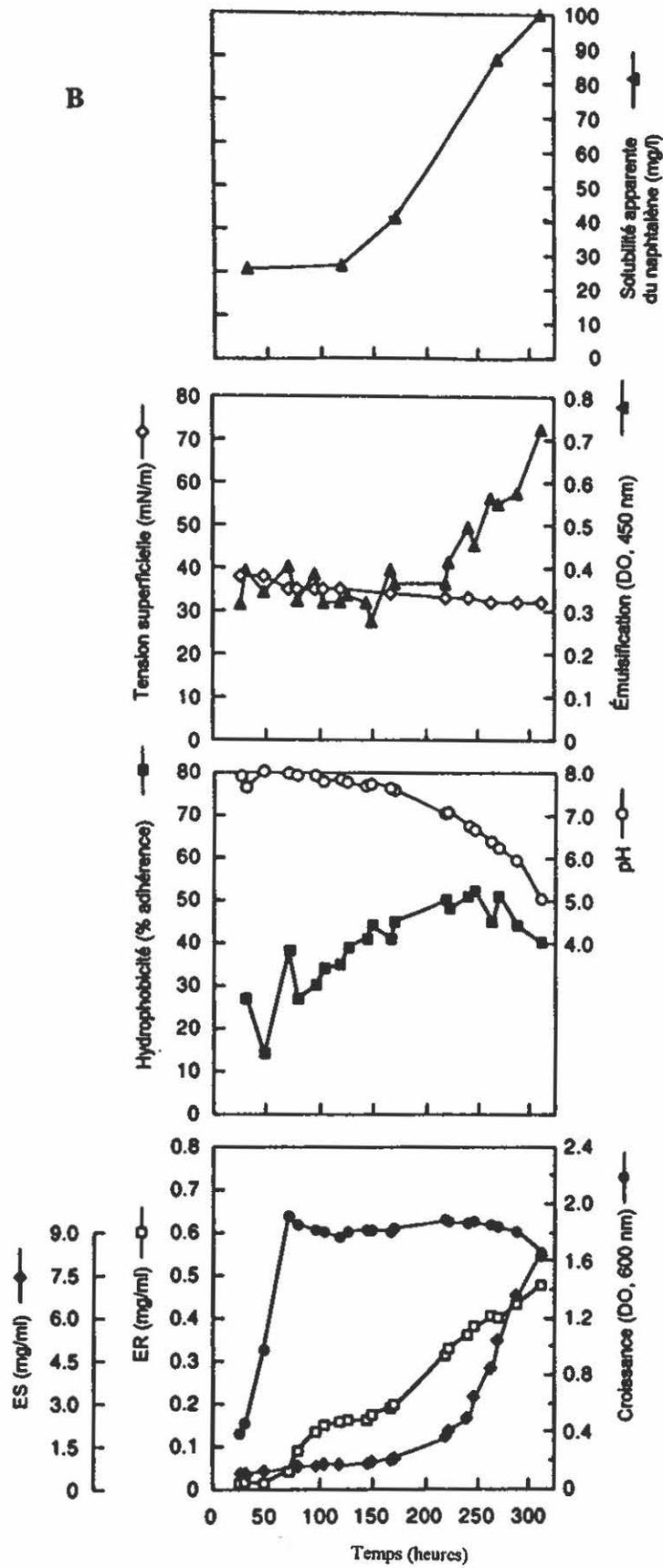
Un pic d'activité émulsifiante n'est observé que dans la culture inoculée avec des cellules lavées (Figure 29A), et il se situe très clairement au début de l'accumulation des rhamnolipides comme dans les Figures 23 et 24A.

**FIGURE 29.** Production de biosurfactants par la souche *Ps. aeruginosa* 19SJ cultivée en milieu minéral SWF avec 2% naphthalène. Cultures incubées à 27°C avec une agitation à 200 rpm. [A] Ensemencement avec cellules lavées. [B] Ensemencement avec culture complète d'une préculture préparée dans les mêmes condition. ES: métabolites aromatiques hydroxylés (produits de la biodégradation du naphthalène) exprimés en équivalents de salicylate. ER: concentration de rhamnolipides (biosurfactants) exprimées en équivalents de rhamnose. MATH: test d'hydrophobicité de la paroi cellulaire, exprimé en pourcentage d'adhérence à une phase liquide hydrophobe (hexadécane).

A



B



## **DISCUSSION**

## **1. MICRO-ORGANISMES**

Les isolats bactériens étudiés au cours de ce projet provenaient d'un sol contaminé par des hydrocarbures mixtes et avaient été sélectionnés pour leur croissance avec l'huile à chauffage (diésel). Bien qu'il soit difficile de prévoir la proportion de la microflore dégradant les HAP et/ou produisant des biosurfactants, la probabilité que de tels micro-organismes se retrouvent en plus grande concentration dans un lieu contaminé est plus élevée (Kästner et al., 1994; Zajic et Seffens, 1984). D'après la littérature de 1 à 4 % des souches microbiennes isolées de l'environnement peuvent produire une activité surfactante (Persson et Molin, 1987; Carrilo et al., 1996), alors que la proportion s'élève jusqu'à 22 % des micro-organismes isolés dans sol contaminé par des hydrocarbures (Parra et al., 1989). Ceci suggérerait une certaine corrélation entre l'utilisation des hydrocarbures et la capacité de produire des biosurfactants. Francy et al. (1991) ont trouvé que des micro-organismes présents dans un sol contaminé par des hydrocarbures étaient avantagés par la production d'agents émulsifiants.

Plus de 75% des isolats bactériens obtenus de la Sablière Thouin appartenaient au groupe des *Pseudomonaceae*. La prédominance des pseudomonades dans les lieux contaminés par des hydrocarbures est un fait établi (Ridgeway et al., 1990). Il est important de noter que la méthode de sélection employée dans nos travaux a pu influencer de façon déterminante les variétés d'espèces microbiennes isolées. Il est également connu qu'un des effets de la pollution sur la microflore dans l'environnement est de réduire la diversité microbienne (Francy et al., 1991).

Les isolats BDP provenaient d'un sol plus fortement contaminé que les isolats de la Sablière Thouin. Ils ont été sélectionnés car ils formaient des zones d'éclaircissement sur milieu minéral avec le fluorène et le fluoranthrène comme seul substrat, ce qu'aucune des souches Thouin ne pouvait accomplir. Jusqu'à présent, peu de micro-organismes capables de dégrader le fluorène, autrement que par co-métabolisme (Stringfellow et Aitken, 1995), ont été rapportés (Grifoll et al., 1992,1994). De plus, la biodégradation de HAP de plus de trois cycles aromatiques est relativement peu documentée. Il était donc intéressant d'isoler de tels micro-organismes afin de d'étudier la contribution possible de la production de biosurfactants sur leur potentiel catabolique.

## **2. CRIBLAGE POUR LA BIODÉGRADATION DES HAP**

Notre approche pour l'étude de la microbiothèque a d'abord consisté à déterminer la capacité d'utilisation des HAP par les bactéries avant d'étudier leur aptitude à produire des biosurfactants. Cette façon d'effectuer la sélection des souches a été dictée par notre hypothèse de travail et parce qu'aucune méthode de criblage simple, pratique et d'une fiabilité reconnue n'était disponible pour détecter la production de biosurfactants, ceci principalement à cause de la très grande diversité de ces molécules.

### **2.1. Pulvérisation des HAP**

La technique de vaporisation des HAP n'est généralement pas utilisée avec le naphthalène qui est considéré trop volatil (Heitkamp et al., 1987; Mueller et al., 1990). Un essai a effectivement démontré qu'en phase gazeuse ce dernier permet la croissance bactérienne. Nous avons néanmoins utilisé la méthode par pulvérisation avec le naphthalène en répétant la pulvérisation au besoin car les résultats étaient plus clairs et plus rapidement obtenus.

Le choix de la méthode de criblage préliminaire avec le naphthalène peut avoir limité le nombre de souches sélectionnées. Cette méthode implique que les micro-organismes doivent pouvoir supporter le contact direct avec un solvant et un HAP à forte dose. Il est probable que le nombre de souches pouvant dégrader les HAP était plus élevé que celui effectivement obtenu. De plus, il y a une possibilité que certaines des souches ne pouvaient pas dégrader le naphthalène dans nos conditions tout en étant capables de dégrader d'autres HAP. Il a été rapporté que le naphthalène peut être toxique pour des bactéries dégradant les HAP (Bouchez et al., 1995; Volkering et al., 1995; Mueller et al., 1990; Weissenfels et al., 1991). Sa toxicité est possiblement due à son hydro-solubilité relativement plus élevée. Les souches sélectionnées étaient donc capables de croître en présence d'une forte concentration de naphthalène.

À l'exception des souches 6 (T, B, J) qui avaient une activité métabolique particulière et les souches 46, 48 et 50 qui démontraient une activité limitée et instable, toutes les souches Thouin

formant une zone d'éclaircissement avec le naphthalène en faisant autant avec les autres HAP de deux et trois cycles.

Cependant, afin de former une zone d'éclaircissement avec les HAP contenant un cycle à cinq atomes (acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, dibenzothiophène et dibenzofurane), un supplément comme l'extrait de levure ou le salicylate devait être ajouté à la gélose. D'après la littérature, ces hydrocarbures ne sont souvent que co-métabolisés.

L'apparition d'une zone d'éclaircissement ne démontre pas nécessairement l'utilisation du HAP pulvérisé comme seul substrat. Cependant, des études ont proposé que la zone d'éclaircissement soit due à la dégradation et non à la solubilisation de la couche d' HAP (Kästner et al., 1994; Grosser et al., 1991). Nos analyses de la gélose prélevée à l'intérieur des zones d'éclaircissement ont effectivement démontré que les HAP ne s'y retrouvaient pas sous une forme solubilisée. De plus, l'expérience de pulvérisation de phénanthrène sur des géloses bleues SW a corroboré ce résultat en démontrant que la production de biosurfactants n'était pas responsable de la formation de zones d'éclaircissement autour des colonies. Puisque les enzymes responsables de la dégradation des HAP sont intracellulaires (Providenti et al., 1993), le mécanisme de formation des zones reste donc partiellement inexplicé. Toutefois, on peut émettre l'hypothèse que les enzymes responsables soient relâchées dans le milieu lors de la lyse des cellules.

Lors de la dégradation bactérienne de certains HAP, des changements de colorations apparaissent souvent dans le milieu de culture; ils sont habituellement associés à l'accumulation de produits de dégradation partielle. Par exemple, une couleur orange-rouge est parfois observée lors de la dégradation du fluoranthène (Mueller et al., 1989a, 1990), un jaune brillant est souvent associé à la biodégradation du fluorène (Grifoll et al., 1992) ainsi qu'une coloration orangée-brune lors de la biodégradation du phénanthrène (Guerin et Jones, 1988a).

Les résultats obtenus avec certaines souches BDP, tel la formation de zones avec le fluoranthène, le pyrène et le benz[a]anthracène par *Sphingomonas* 105 et 107, indiquent que ces bactéries possèdent des caractéristiques cataboliques différentes des souches Thouin.

D'après Berg et al., (1990), *Ps. aeruginosa* UG2 devrait croître sur le naphthalène. Cependant, lors des expériences de pulvérisation des HAP et de croissance en milieu liquide elle n'a jamais pu dégrader un seul type de HAP. Il est possible que cette souche puisse utiliser le naphthalène dans des conditions expérimentales différentes, mais puisque nos méthodes ont fonctionné avec d'autres souches de la même espèce le doute persiste.

## **2.2. Détection de l'activité de la naphthalène dioxygénase**

La conversion de l'indole en indigo est rarement utilisée comme méthode de criblage. Bien que toutes les souches Thouin dégradant un HAP ait transformé l'indole en indigo, certaines des souches BDP n'en effectuaient pas la conversion. Une corrélation presque parfaite (99%) a été montrée entre la présence du gène *nahA* codant pour la naphthalène dioxygénase et la conversion de l'indole (Ahn et al., 1994). Il est intéressant de remarquer que la majorité des souches BDP ne formant pas d'indigo ne produisaient également pas le pigment jaune brillant caractéristique de la dégradation du fluorène. Ce résultat suggère que ces souches puissent utiliser une voie catabolique différente.

Nous avons tenté d'utiliser l'indole pour détecter la stimulation de la voie catabolique par d'autres HAP que le naphthalène. Cependant, l'observation d'une certaine activité constitutive de la naphthalène dioxygénase a rendu difficile l'interprétation de nos résultats. Guerin et Boyd (1995) ont récemment rapporté que l'activité de dégradation du naphthalène est constitutivement présente chez *Ps. putida*. Le test avec différentes concentrations d'indole a également permis d'observer que la naphthalène dioxygénase de *Ps. fluorescens* ne serait pas autant inductible par le naphthalène que chez *Ps. aeruginosa*.

## **3. IDENTIFICATION DES SOUCHES**

L'identification des souches microbiennes utilisant les HAP était essentielle afin d'établir les conditions d'étude de leur capacité à produire des biosurfactants. Cette information devait

grandement augmenter nos chances de réussite, car une grande variété de paramètres influe sur la production de biosurfactants par différentes espèces microbiennes.

À ma connaissance, à ce jour, des *Ps. aeruginosa* dégradant les HAP n'ont jamais été rapportés dans la littérature. Il est possible que ce soit parce que les chercheurs préfèrent ne pas travailler avec cette bactérie du sol considérée "pathogène opportuniste". En effet, *Ps. aeruginosa* n'est pas une espèce reconnue comme G.R.A.S. («generally regarded as safe»).

Il est intéressant de noter que la littérature reliée aux genres microbiens responsables du métabolisme des substances aromatiques est actuellement en pleine transformation. Une publication récente rapporte la reclassification de *Beijerinckia* sp. B1, la première souche décrite pouvant transformer l'acénaphthylène, le benz[a]anthracène et le benzo[a]pyrène (Gibson et al., 1975; Schocken et Gibson, 1984; Mahaffey et al., 1988), en *Sphingomonas yanoikuyae* (Khan et al., 1996). Plusieurs *Sphingomonas* pouvant dégrader une variété de composés aromatiques ont récemment été rapportés (Fredrickson et al., 1995; Wittich et al., 1992) ou reclassifiés (Harms et al., 1991; Mueller et al., 1990; Taira et al., 1988). Il est donc intéressant que les souches 105 et 107 appartiennent au genre *Sphingomonas*.

#### **4. UTILISATION DES HAP**

Le criblage ayant permis d'isoler quelques bactéries démontrant la capacité de dégrader des HAP en milieu gélosé, on devait ensuite étudier leur potentiel d'utilisation comme seul substrat. Puisque le but premier du projet consistait à trouver un micro-organisme produisant du biosurfactant lors de la croissance sur un HAP, nous avons déterminé cette activité en milieu liquide.

##### **4.1. Stimulation par le salicylate de sodium**

Il a été décrit plus haut que le salicylate sert d'inducteur du gène régulateur des opérons *nah* et *sal*. Il a également été démontré que les premières enzymes du métabolisme du naphthalène sont également responsables des premières étapes de la dégradation d'autres HAP, tel le

phénanthrène et l'anthracène (Figure 4). Nous avons donc émis l'hypothèse que le salicylate pourrait activer la biodégradation des HAP autres que le naphthalène, ce qui jusqu'à présent n'a jamais été mentionné dans la littérature.

Cette hypothèse a été vérifiée par nos résultats, particulièrement pour les souches de *Ps. aeruginosa*. En effet, le salicylate de sodium favorise la formation de zones d'éclaircissement par les souches croissant sur milieu gélosé recouvert de HAP pulvérisé, ainsi que leur dégradation en milieu liquide. La stimulation par le salicylate représente un indicateur supplémentaire de la capacité à dégrader les HAP, et fournit des renseignements sur les gènes et voies métaboliques impliquées. Ainsi, la biodégradation de tous les hydrocarbures polyaromatiques testés a été stimulée par l'addition de salicylate de sodium, ce qui démontre l'importance de la voie catabolique du naphthalène (Figure 4).

Le salicylate a permis la formation de zones d'éclaircissement et la production de pigments avec l'acénaphthylène, le fluorène et le biphenyle. En absence de salicylate, ceci n'a pas été observé chez les souches Thouin autres que 6T,B,J. La présence de l'extrait de levure (0,05%) était néanmoins nécessaire, ce qui signifie que ces hydrocarbures ne servent pas de substrats exclusifs pour les souches Thouin HAP+, et ne peuvent également pas induire les enzymes impliqués. Le fluorène n'est souvent dégradé que par co-métabolisme (Stringfellow et Aitken, 1995; Boldrin et al., 1993; Walter et al., 1991). L'apparition de couleurs indique une accumulation de métabolites de dégradation qui peuvent résulter du co-métabolisme (une transformation partielle), ou d'une certaine saturation de la voie enzymatique.

L'addition de salicylate occasionnait toujours l'apparition de pigments dans les géloses et en cultures liquides, indiquant l'accumulation d'intermédiaires de la dégradation. Lors de l'étude avec différentes concentrations de salicylate, l'effet stimulant sur la formation de zones d'éclaircissement était maximal à 100 ppm, cependant à des concentrations supérieures la pigmentation jaune du fluorène continuait à augmenter. Il est alors probable que le salicylate servait de co-substrat. Ogunseitán et Olson (1993) ont obtenu une stimulation optimale entre 50 et 100 ppm de salicylate de sodium. Ils ont également observé que la croissance de certaines

bactéries dégradant le naphthalène était inhibée par des concentrations de salicylate élevées, ce que nos résultats obtenus avec *Ps. fluorescens* 62 confirment.

Cette stimulation agissait différemment pour les *Ps. aeruginosa* que pour les *Ps. fluorescens* et *Ps. putida*. Par exemple, lors de la comparaison de l'effet du salicylate sur la formation de zones d'éclaircissement (Tableau 13), les *fluorescens* ont été autant stimulée que les *aeruginosa* lors de la pulvérisation du fluorène, mais moins avec l'acénaphthylène. De plus, la formation de zones par *Ps. fluorescens* 62 était diminuée par la présence de fortes concentrations de salicylate. Les différences observées suggèrent que les différentes espèces possèdent des voies métaboliques ou des systèmes de régulation distincts. Cidaria et al. (1994) ont récemment rapporté que le salicylate n'induisait pas la dioxygénase chez un *Ps. fluorescens*.

Afin de mieux comprendre le rôle du salicylate, son effet a été comparé à celui de l'addition de naphthalène (Tableau 14 et Figure 14). L'effet du naphthalène était similaire mais à un niveau moindre. Le naphthalène est volatil donc en bonne partie perdu. De plus, il est difficile de déterminer son mode d'action: est-ce par l'augmentation de la densité cellulaire ou par l'activation de la voie catabolique ou par l'induction de cette voie par sa conversion en salicylate ? Également, le naphthalène pourrait compétitionner avec un autre HAP pour la même voie catabolique, ce qui a déjà été rapporté (Stringfellow et Aitken, 1995; Bouchez et al., 1995).

#### **4.2. Étude et optimisation des conditions de dégradation**

Quelques expériences ont été effectuées afin de comparer l'effet de différents suppléments sur la biodégradation.

Lors de l'addition de surfactants une accumulation de pigments colorés similaire à celle observé avec le salicylate était obtenue. L'accumulation de sous-produits de l'opéron supérieur en présence surfactants synthétiques a souvent été rapportée dans la littérature (Guerin et Jones, 1988b; Mueller et al., 1990; Tiehm, 1994). Guerin et Jones (1988a) ont discuté la possibilité que, en présence d'une concentration excessive de HAP, la bactérie pourrait préférer le transformer en métabolites plus solubles avant de compléter la minéralisation. Une telle situation se retrouve en

présence de surfactants parce que ces derniers augmentent la biodisponibilité des HAP par micellisation (Figure 8).

Lors de l'expérience 4.2.4.1. seul le surfactant synthétique Brij 35 a permis la dégradation complète de l'anthracène et du fluorène. Ce résultat indique que le facteur limitant la dégradation de l'anthracène est sa faible solubilité (Tableau 1). *Ps. aeruginosa* 19SJ n'a pas utilisé le Brij 35 comme substrat, et la présence de salicylate ou de co-substrats (PPYE) n'a pas affecté la dégradation de l'anthracène. Aussi, cela démontre que le fluorène n'est dégradé que par co-métabolisme par les *Ps.* isolés de Thouin. Une certaine diminution attribuable soit au naphthalène (probablement disparu après 24 heures), soit au protéose-peptone et extrait de levure avait été observée. Mais en présence de Brij 35, l'anthracène a sans doute servi de co-substrat plus efficacement.

Le Tableau 16 et la Figure 15 montrent que la présence d'un substrat plus disponible comme le mannitol n'empêche pas la dégradation du phénanthrène. Le mannitol a même indirectement favorisé la dégradation. Comme attendu (voir Figures 20 et 21), la dégradation a été plus lente en SW qu'en BH. Il est cependant intéressant de remarquer que la seule culture dans laquelle la dégradation du phénanthrène semble s'être arrêtée avant la fin était celle produisant une quantité significative de biosurfactants. On peut émettre l'hypothèse que le fer étant devenu limitant, la croissance a ralenti et la production des biosurfactants a alors été activée. Ces expériences avaient comme objectif de déterminer si des conditions de culture favorables à la production de biosurfactants allaient permettre l'utilisation d'un HAP, et non de savoir si la production de biosurfactants allait favoriser la dégradation du phénanthrène.

#### **4.3. Biodégradation des HAP de haut poids moléculaire**

L'étude du profil catabolique des bactéries devait permettre d'en isoler une capable d'utiliser des HAP de poids moléculaire élevé, et qui posséderait donc des caractéristiques particulières, comme la capacité de produire des biosurfactants.

Toutes les tentatives avec le fluoranthène et le pyrène sur géloses et en cultures liquides ayant été infructueuses, nous avons effectué des expériences avec des surfactants synthétiques, dans le but de vérifier si seule la faible solubilité pouvait expliquer leur récalcitrance, comme c'était le cas avec l'anthracène.

Malgré plusieurs indications suggérant une certaine dégradation (comme le pigment rouge observé avec le fluoranthène lors de l'expérience 4.2.5.2.), aucune des expériences avec les souches Thouin n'a permis de démontrer avec certitude la disparition d'un HAP de plus de trois cycles aromatiques. Ce fait nous a donc conduit à rechercher de nouveaux micro-organismes plus efficaces. Les poteaux soutenant les fils électriques de l'Hydro-Québec sont traités avec un agent de préservation qui contenant une forte concentration de HAP. Plusieurs isolats bactériens ainsi obtenus démontraient un potentiel intéressant et des caractéristiques métaboliques différentes des souches Thouin. Les souches de *Sphingomonas yanoikuyae* 105 et 107 ont reçu une attention particulière car elles pouvaient former une zone d'éclaircissement et/ou un pigment caractéristique de la biodégradation du fluoranthène, du pyrène et du benz[a]anthracène.

La biodégradation du fluorène, du phénanthrène, du fluoranthène et du pyrène a été confirmée en cultures liquides. De plus, un métabolite de la dégradation du benz[a]anthracène par la souche 107 a été isolé (Annexe). Ce métabolite correspond au seul produit de la dégradation de ce HAP rapporté dans la littérature (Mahaffey *et al.*, 1988). Il est intéressant de remarquer que, comme mentionné plus haut, la souche effectuant cette transformation a récemment été reclassifiée comme une *Sphingomonas yanoikuyae*. Il est probable que l'accumulation de ce métabolite correspond à une étape limitante de la voie catabolique similaire à l'accumulation du salicylate lors de la biodégradation du naphthalène (Shamsuzzaman et Bamsley, 1974), ou de l'acide 1-hydroxy-2 naphthoïque (1H2N) lors du métabolisme du phénanthrène (Guerin et Jones, 1988a). Comme décrit plus haut, la présence d'un surfactant synthétique (ici le Tween 80) favorise l'accumulation de sous-produits de la dégradation.

Comme souligné dans la revue bibliographique, à ce jour, un nombre limité de bactéries pouvant dégrader des HAP de plus de trois cycles aromatiques a été décrit. L'intérêt grandissant

pour les *Sphingomonas* s'explique par le large spectre de composés aromatiques qu'ils peuvent dégrader (Ye et al., 1996; Fredrickson et al., 1995).

Nos résultats semblent indiquer que *Sphingomonas yanoikuyae* 107 peut croître en milieu liquide avec le pyrène comme seul substrat. À ma connaissance, aucune souche bactérienne gram négatif capable d'utiliser ce HAP comme seule source de carbone et d'énergie n'a été décrit dans la littérature. L'addition de salicylate et/ou de Tween 80, ainsi que l'accroissement de l'agitation et de la température d'incubation ont clairement favorisé l'utilisation du pyrène par la 107. Il est intéressant de noter que ces deux paramètres ont eu un effet plus marqué sur les cultures ne contenant pas de Tween 80 (Tableau 17), probablement parce qu'ils augmentent la biodisponibilité comme le surfactant.

Évidemment, le fait que les HAP de haut poids moléculaire ne semblaient pas dégradés par les souches Thouin capables d'utiliser des HAP de 2 et 3 cycles n'exclut pas qu'ils puissent l'être dans des conditions expérimentales différentes. Par exemple, nous n'avons utilisé que deux surfactants synthétiques, et cela à une seule concentration. Tiehm (1994) a montré que la lipophilicité (équilibre hydrophile-lipophile; EHL) et la concentration (CMC) des surfactants synthétiques affecteront leur toxicité et leur efficacité comme agents solubilisants. Certains de nos résultats laissent croire qu'une meilleure connaissance des facteurs limitants faciliterait la dégradation des HAP de plus de trois cycles aromatiques par les souches Thouin.

## **5. PRODUCTION DE BIOSURFACTANTS**

Chez les souches utilisant des HAP comme substrat, la capacité de produire du biosurfactant a ensuite été déterminée. Les deux caractéristiques des biosurfactants, i.e. leurs activités tensioactives et émulsifiantes, étaient étudiées en parallèle.

### **5.1. Criblage**

La production de biosurfactants par *Ps. aeruginosa* étant assez bien documentée, les méthodes de criblage mises en oeuvre découlaient des travaux publiés avec cette espèce. Il est

bien connu que certaines de ces souches peuvent produire du biosurfactant lorsque cultivées en présence d'une forte concentration de dextrose, entre autres. Nous avons donc décidé d'effectuer les premiers essais en milieu BH avec ce substrat facilement assimilable. Tel que mentionné plus haut, la proportion des souches qui produiraient des biosurfactants était imprévisible, l'incidence même de ce phénotype chez *Ps. aeruginosa* n'étant pas documentée.

Toutes nos souches *Ps. aeruginosa* produisaient du biosurfactant dans les conditions testées, alors qu'aucune *Ps. fluorescens* ne le faisait. Notre méthode de criblage était probablement mieux adaptée à *Ps. aeruginosa*. Le milieu de culture ayant servi à Persson et Molin (1987) pour la production d'un des rares biosurfactants détecté chez *Ps. fluorescens* n'a même pas permis la croissance de la plupart de nos souches classifiées comme membres de cette espèce. *Ps. fluorescens* inclut une grande variété de bactéries (Krieg et Holt, 1984).

L'unique *Ps. putida* parmi les souches Thouin HAP+ a aussi produit un biosurfactant. Cela a très rarement été rapporté dans la littérature (Cooper et al., 1981; Bunster et al., 1989) et, à ma connaissance, la structure d'un biosurfactant produit par cette espèce n'a jamais été documentée. Cependant, nos tests suggèrent qu'il soit de la même variété que celui sécrété par *Ps. aeruginosa*.

La nature des biosurfactants produits n'a pas été déterminée complètement. Néanmoins, *Ps. aeruginosa* est connu pour synthétiser et sécréter une mixture de rhamnolipides. (Hisatsuka et al., 1971; Syldatk et al., 1985). La formation d'auréoles sur les géloses bleues SW (Tableau 19) indique que des glycolipides anioniques extracellulaires étaient produits. De plus, la méthode de dosage des biosurfactants lors des cultures en SW (Figures 23 à 25, 28 et 29) implique que les biosurfactants devaient être formés d'une portion lipidique et de pentose.

Il importait de suivre autant la tension superficielle que le potentiel émulsifiant car cela pouvaient permettre de constater la production d'émulsifiants, lesquels n'affectent pas la tension de surface. L'opportunité de cette approche fut démontrée par la découverte d'une activité émulsifiante extracellulaire chez *Sphingomonas* 105 et 107 (Tableau 20; Déziel et al., 1995). Parallèlement à nos travaux, Ashtaputre et Shah (1995a et b) ont identifié un exopolysaccharide démontrant des propriétés émulsifiantes et synthétisé par *Sphingomonas paucimobilis*.

## 5.2. Étude

Les facteurs environnementaux et nutritionnels affectant la production de rhamnolipides par *Ps. aeruginosa* sont bien documentés (Mulligan et Gibbs, 1989; Guerra-Santos et al., 1984, 1986; Manresa et al., 1991; Venkata Ramana et Karanth, 1989; Robert et al., 1989). Un rapport carbone : azote optimal se situant entre 15 et 23 est recommandé (Ochsner et al., 1995c). Les rapports C:N obtenus avec les milieux minéraux BH et SW et un substrat à 2% étaient comparables:

	BH	SW
Dextrose	22,9	24,3
Mannitol	22,6	24,0

Les avantages du milieu SW résident dans la nature de la source d'azote (NO<sub>3</sub> plutôt que de NH<sub>4</sub>) (Guerra-Santos et al., 1984), et à ne pas contenir de fer. Nos résultats indiquent (Tableau 22, Figures 19 et 28) que ce dernier facteur est particulièrement important. Une faible concentration de fer (0,01 g/l de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) était ajoutée au milieu SW afin de permettre une croissance bactérienne suffisante.

La surproduction de rhamnolipides débutait toujours simultanément avec l'apparition d'un pigment bleu-vert (sauf pour les souches 34, 19SJ et 78S), vraisemblablement la pyocyanine. Cela a déjà été rapporté par d'autres (Zhang et Miller, 1992; Ochsner et al., 1994a). Le pigment jaune fluorescent pyoverdine, le sidérophore produit lors de la croissance en conditions limitantes en fer par les *Ps. fluorescents* (Cunliffe et al., 1995) était également sécrété simultanément. Ceci explique la croissance plus lente observée en SW sans addition de fer (e.g. Figures 19 et 22) et probablement aussi la meilleure production de rhamnolipides (Figure 19). Lors de cette expérience, l'accumulation de rhamnolipides a débuté au même moment dans les trois cultures, coïncidant avec la fin de la phase de croissance exponentielle dans les cultures SWF et SWFe, ce qui est en accord avec la littérature (Manresa et al., 1991). Cependant la croissance dans le SW continuait malgré la production de biosurfactants, or on sait que la synthèse des rhamnolipides est induite par

la manque d'azote et/ou de fer (Ochsner *et al.*, 1995c). On peut donc émettre l'hypothèse que des conditions limitantes en azote ont été atteintes en SWF et SWFe, alors que la déficience en fer est responsable de la production en SW.

Avant d'effectuer les essais avec 2% de naphthalène, aucune production de biosurfactants n'avait été détectée dans les cultures lors de la dégradation des HAP. Une des alternatives de cette recherche consistait à fournir un substrat (le mannitol) spécifiquement pour la production de biosurfactants et à en observer les effets d'un et sur un HAP. L'anthracène avait été choisi pour ces expériences car, quoique métabolisé par les souches Thouin HAP+, son utilisation est très lente à cause de sa faible solubilité. Les études comparatives avec et sans anthracène n'ont montré aucun impact évident sur la croissance ou la production de biosurfactants. Aucun lien entre la production de biosurfactants et la dégradation de l'anthracène n'a également été constatée.

### **5.3. Production à partir du naphthalène**

Notre méthode de sélection par la pulvérisation du naphthalène a probablement permis d'isoler des souches tolérantes à de fortes concentrations de naphthalène.

L'expérience de production de rhamnolipides en SW avec différentes concentrations de fer (Figures 28) nous a amené à adopter le SW additionné d'une faible concentration de fer (ratio molaire carbone : fer initial avec 2% naphthalène environ 9300).

L'allure de la cinétique de production des rhamnolipides dans la culture inoculée avec des cellules de 19SJ lavées était très différente de l'inoculation avec la culture complète (Figure 29A et B). La courbe de croissance était similaire dans les deux cultures, ce qui signifie qu'assez de naphthalène était disponible. Néanmoins, quand la densité cellulaire devient trop élevée, la quantité de naphthalène soluble devient limitante (Figure 5). Puisque la production de rhamnolipides dépend également de la biodisponibilité d'un substrat carboné, l'accumulation de biosurfactants plus rapide dans la Figure 29B pourrait s'expliquer par la présence de rhamnolipides dans l'inoculum (clairement démontré par la tension superficielle), accroissant ainsi la solubilité du naphthalène. Les mesures de la solubilité apparente du naphthalène n'appuient cependant pas ce raisonnement.

L'inoculum complet devait également contenir une certaine quantité de l'auto-inducteur responsable de la régulation de la synthèse des rhamnolipides chez *Ps. aeruginosa* (Figure 12). Les auto-inducteurs sont des petites molécules diffusibles membres de la famille des homosérine lactones qui s'accumulent dans le milieu de culture et sont en concentration maximale à la fin de la phase de croissance exponentielle (Ochsner et al., 1995c). Il a été démontré que l'addition de surageant acellulaire contenant de l'auto-inducteur stimule la synthèse des rhamnolipides par une souche mutante ne produisant plus d'auto-inducteur (Ochsner et al, 1995b).

La phase de surproduction de rhamnolipides dans la culture inoculée par des cellules lavées semble avoir nécessité une période d'acclimatation (Figure 29A). Une importante augmentation de l'hydrophobicité cellulaire a été observée au début de la phase stationnaire, en même temps que la première phase de production de biosurfactants. Ceci pourrait faciliter l'adhérence et l'accessibilité aux cristaux de naphthalène, provoquant une augmentation de l'utilisation du substrat et, conséquemment, l'accumulation observée de métabolites de dégradation sous forme de substances aromatiques hydroxylées.

La logique sous-entendant la production de biosurfactants à partir d'un HAP est qu'elle devrait se stimuler elle-même en augmentant la biodisponibilité du substrat. Une accumulation de métabolites du naphthalène était observée au moment de la surproduction de rhamnolipides. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de naphthalène biodisponible dans la pseudo-phase micellaire (Figure 8). Comme discuté précédemment, la présence de surfactants provoque une accumulation de sous-produits de la voie catabolique supérieure (Figure 3).

Les déterminations de la croissance bactérienne par la mesure de l'absorbance ont pu être faussées par les variations de l'hydrophobicité de la surface des bactéries, car elles pouvaient ainsi adhérer aux cristaux de naphthalène et ne donc pas se retrouver en suspension.

Il est intéressant de remarquer que l'accumulation de salicylate pouvait affecter la dégradation du naphthalène puisqu'il est l'inducteur de sa voie catabolique. Il peut, par exemple, avoir stimulé l'utilisation du naphthalène dans la culture inoculée avec le milieu complet puisqu'une

certaines quantités étaient vraisemblablement présentes dans l'inoculum (Figure 29B; la concentration en équivalents de salicylate se situait vers 0,56 mg/ml à 26 heures).

À ma connaissance, un suivi des variations dans le temps de l'hydrophobicité de bactéries croissant sur un HAP n'a jamais été documenté. L'adhérence, dont l'hydrophobicité est un important indicateur (Van Loosdrecht et al., 1987), a été proposée comme un prérequis pour la croissance sur des hydrocarbures liquides dans deux situations: une faible densité cellulaire ou une émulsion insuffisante (Rosenberg et Rosenberg, 1981). Des *Pseudomonas* utilisant l'hexadécane par deux modes d'action différents impliquant l'émulsion ou l'adhérence ont été rapportés (Goswami et Singh, 1991). Il est également connu que les surfactants synthétiques et biologiques affectent l'hydrophobicité de la paroi cellulaire (Neu et Poralla, 1990; Zhang et Miller, 1994). Une publication récente (Arino et al., 1996) propose une nouvelle interprétation de la nature des rhamnolipides qui pourrait expliquer l'apparition d'un pic d'hydrophobicité juste avant la surproduction de rhamnolipides (Figures 28B et 29A). Ces auteurs ont constaté que les rhamnolipides semblent être des constituants de la membrane externe (bande A des LPS) et que leur libération dans le milieu de culture coïncide avec une baisse de l'hydrophobicité de 65% à 30%. L'accumulation de rhamnolipides dans la membrane pourrait donc être responsable de l'accroissement de l'hydrophobicité de la paroi. Cette hypothèse serait en accord avec l'expérience décrite à la Figure 28B, mais plus difficilement avec les autres.

Finalement, le pic d'émulsion observé au début de l'accumulation des rhamnolipides lors de plusieurs expériences pourrait provenir d'un bioémulsifiant distinct des rhamnolipides, tel les facteurs PA (Hisatsuka et al., 1977; Hardegger et al., 1994) ou PM (Burd et Ward, 1996). Il est également possible que la composition de la mixture de rhamnolipides varie dans le temps et que les différentes formes (Figure 10) possèdent des propriétés émulsifiantes différentes.

## **6.PERSPECTIVES**

### **6.1. Rôle physiologique des biosurfactants**

La raison précise pour laquelle des micro-organismes produisent des substances amphiphiles extracellulaires reste en grande partie inexpliquée. Les biosurfactants sont souvent synthétisés par des micro-organismes croissant sur des alcanes linéaires (Hommel, 1990), dans ce cas-ci le lien de cause à effet semble donc évident. Mais puisque plusieurs micro-organismes produisent aussi des biosurfactants durant la croissance sur des substrats hydrosolubles et que la productivité maximale est obtenue lors de la phase stationnaire, le doute persiste sur le véritable rôle de la production de substances tensioactives. Leur fonction n'est pas nécessairement toujours liée à leur nature amphiphile (Haferburg et al., 1986). Puisque la plus grande généralisation qui puisse être faite au sujet des surfactants microbiens est leur très grande diversité de structures et caractéristiques, il est peu probable qu'ils possèdent tous la même fonction (Rosenberg, 1986).

La plupart des biosurfactants manifestent des propriétés antibiotiques (voir résumé dans Haferburg et al., 1986). Les rhamnolipides de *Ps. aeruginosa* ont une activité bactéricide, mycoplasmacide et antivirale (Itoh et al., 1971). Chez *Pseudomonas*, le fer est reconnu pour réguler une série de promoteurs reconnus par un facteur  $\sigma$  distinct. La croissance de *Ps. aeruginosa* en milieu riche en fer réprime non seulement la production de rhamnolipides mais aussi toute une gamme de facteurs de virulence comme l'exotoxine A, la protéase alcaline et l'élastase (Ochsner et al., 1994a). Les rhamnolipides serviraient donc de facteur de virulence (Rendell et al., 1990) et l'excrétion de biosurfactants par *Ps. aeruginosa* pourrait être une façon de modifier son environnement afin de l'aider à compétitionner avec les autres micro-organismes (Banat, 1995).

### **6.2. Lien avec la biodégradation des hydrocarbures**

Une proportion importante des bactéries dégradant les HAP isolées au cours de nos travaux produisent des biosurfactants. Il est toutefois très possible que d'autres isolats de la

Sablère Thouin puissent produire des biosurfactants dans des conditions différentes de celles étudiées, lesquelles étaient particulièrement adaptées à *Ps. aeruginosa*.

Les cinétiques de production des rhamnolipides ont permis d'observer que la concentration requise pour abaisser la tension superficielle était rapidement atteinte et largement dépassée (Figures 23, 24, 25 et 29). Cela s'explique par les très basses CMC des rhamnolipides (Tableau 4; Jain et al., 1992). Un des arguments contre l'hypothèse voulant que les biosurfactants jouent un rôle en tant que facteurs favorisant la biodisponibilité des HAP est qu'ils seraient des métabolites secondaires, donc accessoires à la croissance. Nos résultats ont néanmoins montré qu'en conditions limitantes en fer (milieu SW) la production de rhamnolipides pouvait s'amorcer avant la phase stationnaire (Figures 19 et 23; discuté plus haut). On pourrait donc postuler que des conditions de culture appropriées, n'exigeant pas nécessairement un substrat à forte concentration, permettraient une production de biosurfactants suffisante pour favoriser la solubilisation des hydrocarbures.

Le biotraitement des sols contaminés représente une alternative très intéressante aux technologies traditionnelles (Grosser et al., 1995; Morgan et Watkinson, 1989). Cependant, de nouvelles approches sont requises afin d'améliorer la biodégradation des HAP les plus récalcitrants. Les biosurfactants constituent une solution originale aux coûts élevés et aux nombreux désavantages qu'impliquent l'utilisation de surfactants synthétiques. L'addition de biosurfactants ou de micro-organismes produisant des biosurfactants pourrait améliorer la biodisponibilité des HAP, et ainsi leur dégradation (Providenti et al., 1995). Toutefois, des micro-organismes producteurs de biosurfactants déjà adaptés aux conditions des sites contaminés par des hydrocarbures sont certainement présents. On pourrait donc optimiser les conditions favorisant la production *in situ* de biosurfactants (Van Dyke et al., 1991; Wilson et Jones, 1993), et ainsi éviter la plupart des problèmes rencontrés lors de l'addition de surfactants synthétiques ou biologiques. La biorestauration implique la stimulation de l'activité microbienne indigène, incluant les mécanismes déployés par les micro-organismes pour augmenter l'accessibilité des substrats. À notre avis, Les probabilités seraient meilleures que des micro-organismes utilisant des

hydrocarbures produisent des biosurfactants en concentrations idéales, avec les structures et les spécificités appropriées aux contaminants présents. Les conditions et mécanismes de synthèse et de sécrétion des rhamnolipides sont de mieux en mieux compris (Ochsner et al., 1995c). De faibles concentrations de rhamnolipides dans le micro-environnement de la bactérie productrice devraient suffire parce que leurs CMC sont très bas et les micelles se forment donc facilement (Syldatk et al., 1985; Zhang et Miller, 1995).

## **CONCLUSION**

L'objectif principal de ce projet consistait à isoler des micro-organismes produisant des biosurfactants en utilisant un HAP comme seul substrat. L'hypothèse de travail était basée sur le fait que les bactéries métabolisant des hydrocarbures sont avantagées par la production de biosurfactants et/ou de bioémulsifiants.

Nous avons criblé pour la capacité à dégrader les HAP une banque de 84 isolats bactériens obtenus d'un sol contaminé par une variété d'hydrocarbures. Parmi les 23 souches de *Pseudomonas* obtenues pouvant utiliser au moins un HAP comme source de carbone et d'énergie, dix possédaient la capacité de produire un biosurfactant à partir de substrats solubles comme le dextrose ou le mannitol, ou de HAP comme le naphthalène. Nous avons également étudié treize isolats bactériens obtenus du sol à la base de poteau de transport de l'électricité. Nous avons ainsi isolé deux souches de *Sphingomonas* démontrant le potentiel de dégrader des HAP de haut poids moléculaire, ainsi que de produire un bioémulsifiant.

Jusqu'à maintenant, les quelques publications ayant tenté de trouver une production de biosurfactants par des bactéries dégradant les HAP ont été infructueuses (Arino et al., 1996; Stringfellow et Aitken, 1994; Volkering et al., 1993). Les résultats originaux obtenus semblent donc constituer le premier compte-rendu démontrant la production de substances tensioactives lors de la croissance bactérienne sur des HAP (Déziel et al., 1996).

Nos résultats jettent un éclairage nouveau et différent sur le problème de la biodégradation des HAP, et soulèvent plusieurs interrogations quant à l'importance de tels mécanismes dans l'environnement. Il reste bien sûr à confirmer que la production de biosurfactants par une bactérie métabolisant des polluants récalcitrants comme les HAP fait partie de sa stratégie visant à lui favoriser l'accès aux substrats insolubles. Il est cependant raisonnable de penser que les conditions idéales pour la biorestauration d'un site contaminé soient similaires à celles favorisant la production de biosurfactants, ce qui constituerait une approche nouvelle à l'optimisation des conditions lors des biotraitements. La suite logique de ce projet consisterait donc à établir si un lien de nécessité existe entre la production de biosurfactants lors de la croissance sur un HAP et l'utilisation du substrat.

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier mon directeur de recherche, le Dr. Gilles Paquette, pour sa généreuse disponibilité, sa confiance et son appui constant, ainsi que pour ses conseils lors de la rédaction du mémoire et de la publication.

Je remercie également toute l'équipe du Groupe de l'environnement pour l'agréable atmosphère de travail, et plus particulièrement le Dr. François Lépine et son attaché de recherche Sylvain Milot pour leur aide lors de l'analyse des intermédiaires de dégradation des HAP et pour l'identification de l'acide salicylique comme métabolites, ainsi que le Dr. Richard Villemur et l'étudiant à la maîtrise Fadi Dagher pour l'identification de la souche 107 et les intéressantes discussions.

Un merci à Ginette Denis pour ses précieux conseils et son intérêt lors de la caractérisation des souches bactériennes.

De plus, je veux exprimer ma gratitude à ma grand-mère Françoise Archambault pour sa collaboration quotidienne, ses bienveillantes attentions et sa tolérance.

Et enfin, un merci tout spécial à Zeina, mon abeille, pour ta compréhension, ta confiance en moi, tes encouragements et, bien sûr, ton excellent travail au laboratoire.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Abu-Ruwaida, A. S., I. M. Banat, S. Haditirto, A. Salem, et M. Kadri.** 1991. Isolation of biosurfactant-producing bacteria, product characterization, and evaluation. *Acta Biotechnol.* **4**:315-324.
- Ahn, Y., Sonesson, A., et Sayler, G. S.** 1994. Characterization of PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon)-degrading bacteria from MGP (manufactured gas plant) soils, p. 420. 94th ASM General Meeting, 23-27 mai, Las Vegas, Nevada.
- Ajello, G. W., et A. W. Hoadley.** 1976. Fluorescent pseudomonads capable of growth at 41°C but distinct from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **4**:443-449.
- Alexander, M.** 1991. Research needs. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 1972-1973.
- Arino, S., R. Marchal, et J. P. Vandecasteele.** 1996. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**:162-168.
- Aronstein, B. N., Y. M. Calvillo et M. Alexander.** 1991. Effect of surfactants at low concentration on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* **25**: 1728-1731.
- Aronstein, B. N. et M. Alexander.** 1992. Surfactants at low concentrations stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in samples of aquifer sands and soil slurries. *Environ. Toxic. Chem.* **11**:1227-1133.
- Aronstein, B. N. et M. Alexander.** 1993. Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 386-390.
- Ashtaputre, A. A. et A. K. Shah.** 1995a. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **11**:219-222.
- Ashtaputre, A. A. et A. K. Shah.** 1995b. Studies on a viscous, Gel-Forming exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis* GS1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1159-1162.
- Baker, R. J., W. E. Acree Jr., et C. C. Tsai.** 1984. Correlation and estimation of aqueous solubilities of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Quant. Struct.-Act. Relat.* **3**:10-16.
- Banat, I. M.** 1993. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.* **15**:591-594.
- Banat, I. M.** 1995. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Biores. Tech.* **51**:1-12.
- Banerjee, S., S. Duttagupta, et A. M. Chakrabarty.** 1983. Production of emulsifying agent during growth of *Pseudomonas cepacia* with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid. *Arch. Microbiol.* **135**:110-114.
- Barnsley, E. A.** 1975. The bacterial degradation of fluoranthene and benzo[a]pyrene. *Can. J. Microbiol.* **21**:1004-1008.

- Bauer, J. E., et D. G. Capone.** 1985. Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:81-90.
- Behal, V.** 1986. Enzymes of secondary metabolism in microorganisms. *TIBS* **11**:88-91.
- Berg, G., A. G. Seech, H. Lee, et J. T. Trevors.** 1990. Identification and characterisation of a soil bacterium with extracellular emulsifying activity. *J. Environ. Sci. Health* **25**: 753-764.
- Bertrand, J. C., P. Bonin, M. Goutx, M. Gauthier, et G. Mille.** 1994. The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.* **145**:53-55.
- Blackburn, J. W., et W. R. Hafker.** 1993. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *TIBTECH* **11**:328-333.
- Bock, M., P. Kämpfer, K. Bosecker, et W. Dott.** 1994. Isolation and characterization of heterotrophic, aerobic bacteria from oil storage caverns in northern Germany. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:463-468.
- Boldrin, B., A. Tiehm, et C. Fritzsche.** 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1927-1930.
- Bossert, I., W. Kachel, et R. Bartha.** 1984. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:763-767.
- Bossert, I. D., et R. Bartha.** 1986. Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**:490-495.
- Bouchez, M., D. Blanchet, et J. P. Vandecasteele.** 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:156-164.
- Box, J. D.** 1983. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* **17**:511-525.
- Bunster, L., N. J. Fokkema, et B. Schippers.** 1989. Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf wettability. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1340-1345.
- Burd, G., et O. P. Ward.** 1996. Physicochemical properties of PM- factor, a surface-active agent produced by *Pseudomonas marginalis*. *Can. J. Microbiol.* **42**:243-251.
- Burger, M. M., L. Glaser, et R. M. Burton.** 1963. The enzymatic synthesis of a rhamnose-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **238**:2595-2602.
- Bury, S. J. et C. A. Miller.** 1993. Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **27**:104-110.
- Bushnell, L. D. et H. F. Haas.** 1941. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *J. Bacteriol.* **41**:653-673.

- 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.* **44**:225-229.
- Cane, P. A., et P. A. Williams.** 1986. A restriction map of naphthalene catabolic plasmid pWW60-1 and the location of some of its catabolic genes. *J. Gen. Microbiol.* **132**:2919-2929.
- Carrilo, P. G., C. Mardaraz, S. I. Pitta-Alvarez, et A. M. Giulietti.** 1996. Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**:82-84.
- Cerniglia, C. E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**:351-368.
- Cerniglia, C. E.** 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **4**:331-338.
- Cerniglia, C. E.** 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, p. 31-69 *In* Advances in applied microbiology. Academic Press, Inc.,
- Cerniglia, C. E., and Heitkamp, M. A.** 1989. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the aquatic environment, p. 41-68 *In* U. Varanassi (ed.), Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Chandrasekaran, E. V., and BeMiller, J. N.** 1980. Constituent analysis of glucosaminoglycans, p. 89-96 *In* Methods in carbohydrate chemistry. R.L. Whistler (ed.). Academic Press, Inc., New York.
- Churchill, S. A., R. A. Griffin, L. P. Jones, et P. F. Churchill.** 1995. Biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. *J. Environ. Qual.* **24**:19-28.
- Cidaria, D., F. Deidda, et A. Bosetti.** 1994. A rapid method for naphthalene dioxygenase assay in whole cells of naphthalene *cis*-dihydrodiols dehydrogenase blocked *Pseudomonas fluorescens*: Screening of potential inducers of dioxygenase activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41**:689-693.
- Cooper, D. G., S. N. Liss, R. Longay, et J. E. Zajic.** 1981. Surface activity of *Mycobacterium* and *Pseudomonas*. *J. Ferment. Technol.* **59**:97-101.
- Cunliffe, H. E., T. R. Merriman, et I. L. Lamont.** 1995. Cloning and characterization of *pvdS*, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *J. Bacteriol.* **177**:2744-2750.
- Cutright, T. J. et S. Lee.** 1994. Microorganisms & metabolic pathways for remediation of PAH contaminated soil. *Fresenius Envir. Bull.* **3**:413-421.
- Davies, J. L. et W. C. Evans.** 1964. Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads: the ring fission mechanism. *Biochem. J.* **91**:251-261.

- de Andrés, C., M. E. Mercadé, J. Guinea, et A. Manresa. 1994. 7, 10-dihydroxy-8(E)-octadecenoic acid produced by *Pseudomonas* 42A2: evaluation of different cultural parameters of the fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**:106-109.
- Denome, S. A., D. C. Stanley, E. S. Olson, et K. D. Young. 1993. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *J. Bacteriol.* **175**:6890-6901.
- Desai, A. J., K. M. Patel, et J. D. Desai. 1988. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. *Current Science* **57**:500-501.
- Déziel, É. G. Paquette, J.-G. Bisailon, F. Lépine, et R. Beaudet. 1995. Biodegradation of pyrene by a bioemulsifier-producing strain of *Sphingomonas*. Poster. 95th ASM General Meeting, 21-25 mai, Washington, D.C.
- Déziel, É., G. Paquette, R. Villemur, F. Lépine, et J. Bisailon. 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1908-1912.
- Dipple, A., Cheng, S. C., et Bigger, C. A. H. 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbons carcinogens, p. 108-127 *In* Mutagens and carcinogens in the diet. M. W. Pariza, H. V. Aeschbacher, J. S. Felton, and S. Sato. Wiley-Liss, New York.
- Ducreux, J., Ballerini, D., et Bocard, C. 1994. The role of surfactants in enhanced in situ bioremediation, p. 237-242 *In* Hydrocarbon Bioremediation. R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoepfel, and R.N. Miller. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Dutton, G. 1993. Surfactants emerges as growth area in bioremediation field. *Genetic Engineering News* **18**:1.
- Dzombak, D. A. et R. G. Luthy. 1984. Estimating adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils. *Soil Science* **137**:292-308.
- Eaton, R. W. et P. J. Chapman. 1992. Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J. Bacteriol.* **174**:7542-7554.
- Edwards, D. A., Liu, Z., et R. G. Luthy. 1994. Surfactant solubilization of organic compounds in soil/aqueous systems. *J. Environ. Eng. ASCE* **120**:5-22.
- Edwards, D. A., R. G. Luthy, et Z. Liu. 1991. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. *Environ. Sci. Technol.* **25**:127-133.
- Edwards, J. R. et J. A. Hayashi. 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**:415-421.
- Efroymsen, R. A. et M. Alexander. 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1441-1447.
- Ensley, B. D., B. J. Ratzkin, T. D. Osslund, M. J. Simon, L. P. Wackett, et D. T. Gibson. 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science* **222**:167-169.

- Erickson, D. C., R. C. Loehr, et E. F. Neuhauser. 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. *Wat. Res.* **27**:911-919.
- Falatko, D. M. et J. T. Novak. 1992. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.* **64**:163-169.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* **10**:208-217.
- Francy, D. S., J. M. Thomas, R. L. Raymond, et C. H. Ward. 1991. Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J. Ind. Microbiol.* **8**:237-246.
- Fredrickson, J. K., D. L. Balkwill, G. R. Drake, M. F. Romine, D. B. Ringelberg, et D. C. White. 1995. Aromatic-degrading *Sphingomonas* isolates from the deep subsurface. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1917-1922.
- Georgiou, G., S. Lin, et M. M. Sharma. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Bio/Technology* **10**:60-65.
- 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* **189**: 295-297.
- Goclik, E., R. Müller-Hurtig, et F. Wagner. 1990. Influence of the glycolipid-producing bacterium *Rhodococcus erythropolis* on the degradation of a hydrocarbon mixture by an original soil population. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:122-126.
- Goswami, P. et H. D. Singh. 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:1-11.
- Grifoll, M., M. Casellas, J. M. Bayona, et A. M. Solanas. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2910-2917.
- Grifoll, M., S. A. Selifonov, et P. J. Chapman. 1994. Evidence for a novel pathway in the degradation of fluorene by *Pseudomonas* sp. strain F274. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2438- 2449.
- 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.* **61**: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.* **30**: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.* **57**:3462-3469.
- Grosser, R. J., D. Warshawsky, et J. R. Vestal. 1995. Mineralization of polycyclic and *n*-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**:375-382.

- Guerin, W. F., et S. A. Boyd.** 1992. Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1142-1152.
- Guerin, W. F., et S. A. Boyd.** 1995. Maintenance and induction of naphthalene degradation activity in *Pseudomonas putida* and an *Alcaligenes* sp. under different culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4061-4068.
- Guerin, W. F. et G. E. Jones.** 1988a. Two-stage mineralization of phenanthrene by estuarine enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:929-936.
- Guerin, W. F. et G. E. Jones.** 1988b. Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 937-944.
- Guerra-Santos, L. H., O. Käppeli, et A. Fiechter.** 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:301-305.
- Guerra-Santos, L. H., O. Käppeli, et A. Fiechter.** 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**:443-448.
- Gutnick, D. L. et E. Rosenberg.** 1977. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Ann. Rev. Microbiol.* **31**:379-396.
- Haferburg, D., R. Hommel, R. Claus, et H. Kleber.** 1986. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* **33**:53-93.
- Hardegger, M., A. K. Koch, U. A. Ochsner, A. Fiechter, et J. Reiser.** 1994. Cloning and heterologous expression of a gene encoding an alkane-induced extracellular protein involved in alkane assimilation from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3679-3687.
- Harms, H., H. Wilkes, V. Sinnwell, R. Wittich, K. Figge, W. Francke, et P. Fortnagel.** 1991. Transformation of 3- chlorodibenzofuran by *Pseudomonas* sp. HH69. *FEMS Microbiol. Lett.* **81**:25-30.
- Harvey, S., I. Elashvili, J. J. Valdes, D. Kamely, et A. M. Chakrabarty.** 1990. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology* **8**: 228-230.
- Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, et C. E. Cerniglia.** 1987. Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: estimates of degradation rates and characterization of metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:129-136.
- Heitkamp, M. A., W. Franklin, et C. E. Cerniglia.** 1988a. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2549-2555.
- Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller, et C. E. Cerniglia.** 1988b. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2556-2565.

- Herbes, S. E. et L. R. Schwall. 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum- contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:306-316.
- Hisatsuka, K., T. Nakahara, N. Sano, et K. Yamada. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agr. Biol. Chem.* **35**:686- 692.
- Hisatsuka, K., T. Nakahara, Y. Minoda, et K. Yamada. 1977. Formation of protein-like activator for *n*-alkane oxidation and its properties. *Agric. Biol. Chem.* **41**:445-450.
- Hommel, R. K. 1990. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation* **1**:107-119.
- Hommel, R. K. et C. Ratledge. 1993. Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. *In Biosurfactants: production, properties, applications.* Surfactant science vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Hunt, W. P., K. G. Robinson, et M. M. Ghosh 1994. The role of biosurfactants in biotic degradation of hydrophobic organic compounds, p. 318-322 *In* R.E. Hinchee, B.C. Alleman, R.E. Hoepfel, and R.N. Miller (ed.), *Hydrocarbon Bioremediation.* Lewis Publishers, Boca Raton
- Ishigami, Y., Y. Gama, F. Ishii, et Y. K. Choi. 1993. Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfactant. *Langmuir* **9**:1643-1636.
- Ishigami, Y., Y. Gama, H. Nagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara, et T. Kamata. 1987. The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. *Chem. Lett.* 763-766.
- Itoh, S., H. Honda, F. Tomita, et T. Suzuki. 1971. Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on *n*-paraffin (mixture of C12, C13 and C14 fractions). *J. Antibiot.* **24**:855-859.
- Itoh, S. et T. Suzuki. 1972. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in *n*-paraffin-utilizing ability. *Agr. Biol. Chem.* **36**:2233-2235.
- Jain, D. K., D. L. Collins-Thompson, H. Lee, et J. T. Trevors. 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods* **13**:271-279.
- Jain, D. K., H. Lee, et J. T. Trevors. 1992. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. *J. Ind. Microbiol.* **10**:87-93.
- Janiyani, K. L., S. R. Wate, et S. R. Joshi. 1992. Surfactant production by *Pseudomonas stutzeri*. *J. Microb. Biotechnol.* **7**:18- 21.
- Janke, D. et W. Fritsche. 1985. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *J. Basic Microbiol.* **25**: 603-619.

- Jarvis, F. G. et M. J. Johnson. 1949. A glyco-lipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Am. Chem. Soc. 71:4124-4126.
- Karickhoff, S. W., D. S. Brown, et T. A. Scott. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. Wat. Res. 13:241- 248.
- 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. 41:267-273.
- Keith, L. H. et W. A. Telliard. 1979. Priority pollutants. I-a perspective view. Environ. Sci. Technol. 13:416-423.
- Kelley, I. et C. E. Cerniglia. 1991. The metabolism of fluoranthene by a species of *Mycobacterium*. J. Ind. Microbiol. 7: 19-26.
- 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. Env. Microbiol. 57: 636-641.
- Keuth, S. et H.-J. Rehm. 1991. Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 804-808.
- Khan, A. A., R. Wang, W. Cao, W. Franklin, et C. E. Cerniglia. 1996. Reclassification of a polycyclic aromatic hydrocarbon- metabolizing bacterium, *Beijerinckia* sp. strain B1, as *Sphingomonas yanoikuyae* by fatty acid analysis, protein pattern analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S ribosomal DNA sequencing. Int. J. Syst. bacteriol. 46:466-469.
- Khire, J. M. et M. I. Khan. 1994. Microbially enhanced oil recovery (MEOR). Part 2. Microbes and the subsurface environment for MEOR. Enzyme Microb. Technol. 16:258-259.
- Kim, J., M. Powalla, S. Lang, F. Wagner, H. Lünsdorf, et V. Wray. 1990. Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. J. Biotechnol. 13:257-266.
- King, E. O., M. K. Ward, et D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44:301.
- Kiyohara, H., K. Nagao, et K. Yana. 1982. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. Appl. Environ. Microbiol. 43:454-457.
- Kiyohara, H., S. Torigoe, N. Kaida, T. Asaki, T. Iida, H. Hayashi, et N. Takizawa. 1994. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. J. Bacteriol. 176:2439-2443.
- Koch, A. K., O. Käppeli, A. Fiechter, et J. Reiser. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J. Bacteriol. 173:4212-4219.
- Kosaric, N. (ed). 1993. Biosurfactants: production, properties, applications. Surfactant science series vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York.

- Komatsu, T., T. Omori, et T. Kodama.** 1993. Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene by a pure bacterial culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**:864-865.
- Krieg, N. R. et Holt, J. G. (ed.)**.1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Laha, S. et R. G. Luthy.** 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil- water systems. *Biotechnol. Bioeng.* **40**:1367-1380.
- Laha, S. et R. G. Luthy.** 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **25**:1920-1930.
- Larose, Y.** 1993. Des microbes qui nettoient les sols contaminés. *Québec Science* **31**:42-43.
- Leahy, J. G. et R. R. Colwell.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**:305-315.
- Lin, S., M. A. Minton, M. M. Sharma, et G. Georgiou.** 1994. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:31-38.
- Lindstrom, J. E., R. C. Prince, J. C. Clark, M. J. Grossman, T. R. Yeager, J. F. Braddock, et E. J. Brown.** 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V *Exxon Valdez* oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2514-2522.
- Liu, Z., D. A. Edwards, et R. G. Luthy.** 1992. Sorption of nonionic surfactants onto soil. *Water Res.* **26**:1337-1345.
- Liu, Z., S. Laha, et R. G. Luthy.** 1991. Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil-water systems. *Water Sci. Technol.* **23**:475-485.
- Liu, Z., A. M. Jacobson, et R. G. Luthy.** 1995. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:145-151.
- Mackay, D. et W. Y. Shiu.** 1977. Aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J. Chem. Eng. Data* **22**:399-402.
- Madsen, E. L.** 1991. Determining in situ biodegradation: Facts and challenges. *Environ. Sci. Technol.* **25**:1663-1673.
- Mahaffey, W. R., D. T. Gibson, et C. E. Cerniglia.** 1988. bacterial oxidation of chemical carcinogens: formation of polycyclic aromatic acids from benz[a]anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2415-2423.
- Manilal, V. B. et M. Alexander.** 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:401-405.
- Manresa, A., J. Bastida, M. E. Mercadé, Robert. M., C. de Andrés, M. J. Espuny, et J. Guinea.** 1991. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *J. Ind. Microbiol.* **8**: 133-136.

- Means, J. C., S. G. Wood, J. J. Hassett, et W. L. Banwart. 1980. Sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by sediment and soils. *Environ. Sci. Technol.* **14**:1524-1528.
- Mihelcic, J. R., D. R. Lueking, R. J. Mitzell, et J. M. Stapleton. 1993. Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation* **4**:141-153.
- Mihelcic, J. R. et R. G. Luthy. 1988. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1182-1187.
- Miller, R. M. et R. Bartha. 1989. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:269-274.
- Molin, G. et Ternström, A. 1982. Numerical taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonads*. *J. Gen. Microbiol.* **128**:1249-1264.
- Morgan, P. et R. J. Watkinson. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **8**:305-333.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, et P. H. Pritchard. 1989a. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3085-3090.
- Mueller, J. G., P. J. Chapman, et P. H. Pritchard. 1989b. Creosote-contaminated sites: their potential for bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **23**:1197-1201.
- 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.* **56**:1079-1086.
- Mueller, J. G., D. P. Middaugh, S. E. Lantz, et P. J. Chapman. 1991. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: chemical and biological assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1277-1285.
- Müller-Hurtig, R., F. Wagner, R. Blaszczyk, et N. Kosaric. 1993. Biosurfactants for environmental control, p. 447-469 *In* Biosurfactants: production, properties, applications. Surfactant science vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Mulligan, C. N. et B. F. Gibbs. 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3016-3019.
- Mulligan, C. N., G. Mahmoudides, et B. F. Gibbs. 1989. Biosurfactant production by a chloramphenicol tolerant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **12**:37-44.
- Murdock, D., B. D. Ensley, C. Serdar, et M. Thalen. 1993. Construction of metabolic operons catalyzing the *de novo* biosynthesis of indigo in *Escherichia coli*. *Bio/Technology* **11**: 381-386.
- Neu, T. R. et K. Poralla. 1990. Emulsifying agents from bacteria isolated during screening for cells with hydrophobic surfaces. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:521-525.

- Oberbremer, A., R. Müller-Hurtig, et F. Wagner. 1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:485-489.
- Ochsner, U. A., A. K. Koch, A. Fiechter, et J. Reiser. 1994a. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **176**:2044-2054.
- Ochsner, U. A., A. Fiechter, et J. Reiser. 1994b. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**:19787-19795.
- Ochsner, U. A., et J. Reiser. 1995a. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:6424-6428.
- Ochsner, U. A., J. Reiser, A. Fiechter, et B. Witholt. 1995b. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3503-3506.
- Ochsner, U. A., T. Hembach, et A. Fiechter. 1995c. Production of rhamnolipid biosurfactants. *Advances in Biochemical Engineering* **53**:89-118.
- Ogunseitan, O. A. et B. H. Olson. 1993. Effect of 2- hydroxybenzoate on the rate of naphthalene mineralization in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**:799-807.
- Owens, D. R. et R. M. Keddie. 1969. The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **32**:338- 347.
- Paquette, G., Bisailon, J. G., Lépine, F., Fontaine, R., Roy, V., et Lauzon, J. 1993a. Biodégradation des hydrocarbures en sols. Isolement et caractérisation des microorganismes et optimisation en milieu synthétique. Recherche et démonstration du traitement biologique de sols contaminés par des hydrocarbures. Sablière Thouin. Rapport d'étape No.2.
- Paquette, G., Lépine, F., Milot, S., Beaudet, R., Bisailon, J. G., Fontaine, R., Roy, V., et Lauzon, J. +. 1993b. Biotraitement des sols contaminés par des hydrocarbures. Sablière Thouin, p. 101-110. 3e Symposium annuel sur la restauration des eaux souterraines et des sols contaminés. Québec.
- Park, K. S., R. C. Sims, R. R. Dupont, W. J. Doucette, et J. E. Matthews. 1990a. Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.* **9**:187-195.
- Park, K. S., R. C. Sims, et R. R. Dupont. 1990b. Transformation of PAHs in soil systems. *J. Environ. Eng.* **116**:632-640.
- Parra, J. L., J. Guinea, M. A. Manresa, M. Robert, M. E. Mercadé, F. Comelles, et M. P. Bosch. 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *J. Am. Chem. Soc.* **66**: 141-145.

- Persson, A. et G. Molin.** 1987. Capacity for biosurfactant production of environmental *Pseudomonas* and *Vibrionaceae* growing on carbohydrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**:439-442.
- 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.* **17**:15-26.
- Providenti, M. A., H. Lee, et J. T. Trevors.** 1993. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. *J. Ind. Microbiol.* **12**:379-395.
- Ramsay, B., J. McCarthy, L. Guerra-Santos, O. Kappeli, A. Fiechter, et A. Margaritis.** 1988. Biosurfactant production and diauxic growth of *Rhodococcus aurantiacus* when using *n*-alkanes as the carbon source. *Can. J. Microbiol.* **34**:1209-1212.
- Reiser, J., A. K. Koch, U. A. Ochsner, et A. Fiechter.** 1993. Genetics of surface-active compounds. *In* Biosurfactants: production, properties, applications. Surfactant science vol. 48, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Rendell, N. B., G. W. Taylor, M. Somerville, H. Todd, R. Wilson, et P. J. Cole.** 1990. Characterization of *Pseudomonas* rhamnolipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1045**:189-193.
- Ridgway, H. F., J. Safarik, D. Phipps, P. Carl, et D. Clark.** 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3565-3575.
- Robert, M., M. E. Mercadé, M. P. Bosch, J. L. Parra, M. J. Espuny, A. Manresa, et J. Guinea.** 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol. Lett.* **11**:871-874.
- Rocha, C., F. San-Blas, G. San-Blas, et L. Vierma.** 1992. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **8**:125-128.
- Rosenberg, E., A. Zuckerberg, C. Rubinovitz, et D. L. Gutnick.** 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**:402-408.
- Rosenberg, E.** 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbons- new markets. *TIBTECH* **11**:419-424.
- Rosenberg, E.** 1986. Microbial surfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **3**:109-132.
- Rosenberg, M.** 1991. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon:water interface. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**:159-173.
- Rosenberg, M. et E. Rosenberg.** 1981. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. *J. Bacteriol.* **148**:51-57.
- Rouse, J. D., D. A. Sabatini, J. M. Sufilita, et J. H. Harwell.** 1994. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **24**:325-370.

- Sanseverino, J., B. M. Applegate, J. M. H. King, et G. S. Sayler.** 1993. Plasmid-mediated mineralization of naphthalene, phenanthrene, and anthracene. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1931- 1937.
- Scheibenbogen, K., R. G. Zytner, H. Lee, et J. T. Trevors.** 1994. Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactants. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**:53-59.
- Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, et D. Warshawsky.** 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:13-19.
- Schocken, M. J. et D. T. Gibson.** 1984. Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**:10-160.
- Shafeeq, M., D. Kokub, Z. M. Khalid, A. M. Khan, et K. A. Malik.** 1989. Degradation of different hydrocarbons and production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from coastal waters. *MIRCEN J.* **5**:505-510.
- Shamsuzzaman, K. M. et E. A. Barnsley.** 1974. The regulation of naphthalene oxygenase in *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* **83**:165- 170.
- Shuttleworth, K. L. et C. E. Cerniglia.** 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. *Appl. Biochem. Biotech.* **54**:291- 302.
- Siegmund, I. et F. Wagner.** 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Tech.* **5**:265-268.
- Sims, R. C. et M. R. Overcash.** 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAS) in soil-plant systems. *Residue Rev.* **88**: 1-68.
- Singleton, I.** 1994. Microbial metabolism of xenobiotics: fundamental and applied research. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **59**: 9-23.
- Stringfellow, W. T. et M. D. Aitken.** 1994. Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonads isolated from a creosote-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* **40**:432-438.
- Stringfellow, W. T. et M. D. Aitken.** 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:357-362.
- Stucki, G. et M. Alexander.** 1987. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:292-297.
- Sutherland, J. B.** 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *J. Ind. Microbiol.* **9**:53-62.
- Syldatk, C., S. Lang, F. Wagner, V. Wray, et L. Witte.** 1985. Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on *n*-alkanes. *Z. Naturforsch.* **40c**:51-60.

- Sylvestre, M. 1980. Isolation method for bacterial isolates capable of growth on *p*-chlorobiphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:1223-1224.
- Taira, K., N. Hayase, N. Arimura, S. Yamashita, T. Miyazaki, et K. Furukawa. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the 2,3- dihydroxybiphenyl dioxygenase gene from the PCB-degrading strain of *Pseudomonas paucimobilis* Q1. *Biochemistry* **27**:3990-3996.
- Takizawa, N., N. Kaida, S. Torigoe, T. Moritani, T. Sawada, S. Satoh, et H. Kiyohara. 1994. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *J. Bacteriol.* **176**:2444-2449.
- Thomas, J. M., J. R. Yordy, J. A. Amador, et M. Alexander. 1986. Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:290-296.
- Tiehm, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:258-263.
- Van Dyke, M. I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee, et J. T. Trevors. 1993a *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* **39**:1071-1078.
- Van Dyke, M. I., S. L. Gulley, H. Lee, et J. T. Trevors. 1993b Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *J. Ind. Microbiol.* **11**:163-170.
- Van Dyke, M. I., H. Lee, et J. T. Trevors. 1991. Applications of microbial surfactants. *Biotech. Adv.* **9**:241-252.
- Van Loosdrecht, M. C. M., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, et A. J. B. Zehnder. 1987. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1893-1897.
- Venkata Ramana, K. et N. G. Karanth. 1989. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **45**:249-257.
- Vigon, B. W. et A. J. Rubin. 1989. Practical considerations in the surfactant-aided mobilization of contaminants in aquifers. *J. Water Pollut. Control Fed.* **61**:1233-1240.
- Volkering, F., A. M. Breure, A. Sterkenburg, et J. G. Van Andel. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:548-552.
- Volkering, F., M. Breure, et J. G. Van Andel. 1993. Effect of micro-organisms on the bioavailability and biodegradation of crystalline naphthalene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**:535-540.
- 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.* **61**:1699-1705.

- Walter, U., M. Beyer, J. Klein, et H. J. Rehm. 1991. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:671-676.
- Weissenfels, W. D., M. Beyer, et J. Klein. 1990. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**:479-484.
- Weissenfels, W. D., M. Beyer, J. Klein, et H. J. Rehm. 1991. Microbial metabolism of fluoranthene: isolation and identification of ring fission products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**:528-535.
- Weissenfels, W. D., H. Klewer, et J. Langhoff. 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:689-696.
- West, C. C. et J. H. Harwell. 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.* **26**:2324-2330.
- White, K. L. 1986. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Carcinogen. Rev.* **C4**:163-202.
- Whitman, R. E., Lueking, D. R., and Mihelcic, J. R. 1995. Naphthalene assimilation by a *Pseudomonas fluorescens* isolate, 95th ASM General Meeting. , 1921
- Wilson, S. C. et K. C. Jones. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* **81**:229-249.
- Wittich, R., H. Wilkes, V. Sinnwell, W. Francke, et P. Fortnagel. 1992. Metabolism of dibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas* sp. strain RW1. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1005-1010.
- Wodzinski, R. S., et J. E. Coyle. 1974. Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria. *Appl. Microbiol.* **27**: 1081-1084.
- Yabuuchi, E., I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T. Ezaki, et H. Yamamoto. 1990. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* **34**:99-119.
- Yamaguchi, M., M. Sato et K. Yamada. 1976. Microbial production of sugar lipids. *Chem. Ind.* **17**:741-742.
- Yang, Y., R. F. Chen, et M. P. Shiaris. 1994. Metabolism of naphthalene, fluorene, and phenanthrene: preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *J. Bacteriol.* **176**:2158-2164.
- Ye, D., A. Siddiqi, A. E. Maccubin, S. Kumar, et H. C. Sikka. 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environ. Sci. Technol.* **30**:136-142.
- Yen, K. M. et C. M. Serdar. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in Pseudomonads. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **15**:247-268.
- Zajic, J. E. et W. Seffens. 1984. Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* **1**:87-107.

- Zhang, Y. et R. M. Miller. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3276-3282.
- Zhang, Y. et R. M. Miller. 1994. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2101-2106.
- Zhang, Y. et R. M. Miller. 1995. Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation on *n*-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2247-2251.

## ANNEXE

### Détection de certains métabolites de la biodégradation des HAP par des analyses au GC-MS

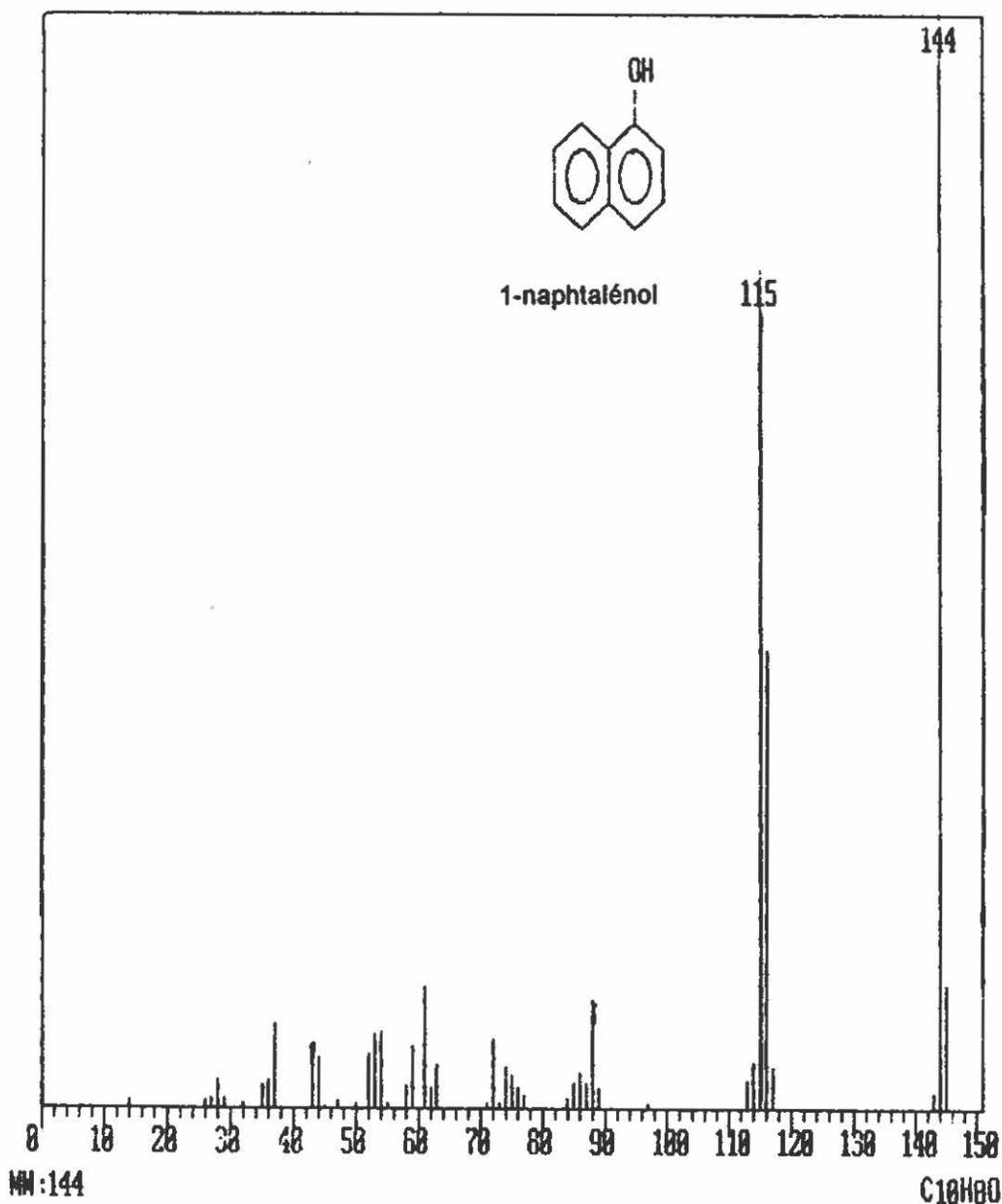
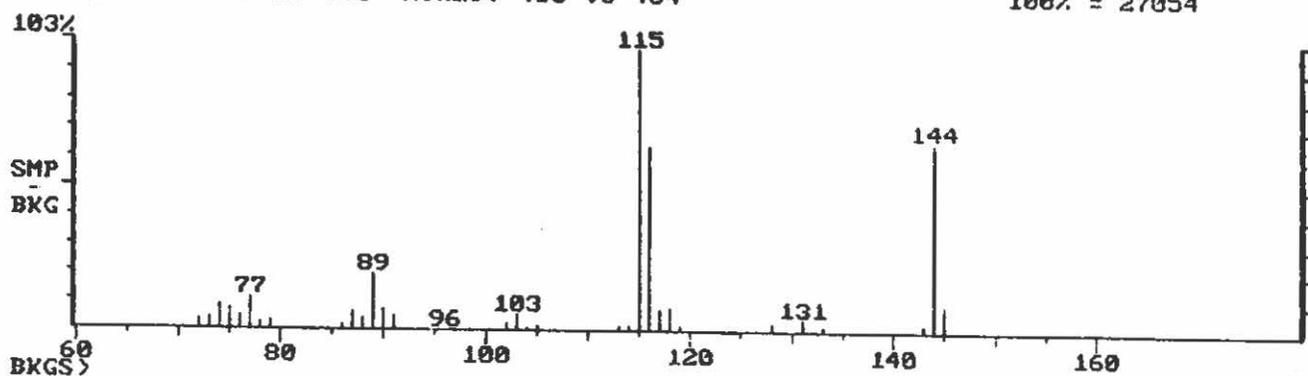
Nous avons analysés la gélose sous les zones d'éclaircissement obtenues lors de l'analyse de la souche 19SJ par pulvérisation de naphthalène. Premièrement, le naphthalénol ( $\alpha$ - ou  $\beta$ -naphtol) a été détecté (Figure 30) puis, après triméthylsilylation, le salicylate (non-montré). Ce dernier représente l'intermédiaire de la biodégradation du naphthalène reconnu pour s'accumuler (Figure 3). Une mixture des deux isomères du naphtol serait obtenue par la déshydratation en condition acide du 1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphthalène (naphthalène dihydrodiol) (Eaton et Chapman, 1992). Or la procédure d'extraction incluait une acidification (voir matériel et méthodes 5.1.1.)

Lors d'une expérience similaire effectuée avec les souches de l'isolat 6, des métabolites différents ont été identifiés: le coumarin et le dihydro-coumarin (Figure 31). Le coumarin est un produit d'une impasse métabolique («dead-end») qui peut se former spontanément à partir d'un des isomères du *o*-hydroxybenzylidenepyruvate, un intermédiaire de la dégradation du naphthalène (Davies et Evans, 1964). Une fois de plus, il est intéressant de remarquer que les souches 6 démontrent une activité catabolique différente des autres souches de Thouin. Rappelons notamment la capacité de former une zone et/ou un pigment avec l'acénaphthylène et le biphényl, et la production d'un pigment rouge à partir du naphthalène lors de la stimulation avec le salicylate. Denome et al., (1993) ont noté l'accumulation de coumarin et de dihydro-coumarin lorsqu'ils ont bloqué la voie catabolique du naphthalène en rendant inopérant un gène qui coderait pour la *cis-o*-hydroxybenzylidene pyruvate aldolase (Figure 32). Les souches 6 possèdent une naphthalène dioxygénase puisqu'elles peuvent convertir l'indole en indigo. Cependant, il est possible qu'elles portent une mutation dans un gène codant pour une des enzymes de la fin de l'opéron supérieur.

**FIGURE 30.** Fragmentogramme d'un métabolite présumé de la biodégradation du naphthalène isolé d'une zone d'éclaircissement (méthode par pulvérisation des HAP) autour d'une colonie de *Ps. aeruginosa* 19SJ. En bas, fragmentogramme du 1-naphthaléol.

Background Subtract  
Comment: HAP\_ZONE (NA) #198 a:HAPZON3  
Average of: 433 to 441 Minus: 458 to 484

Acquired: Feb-26-1994 09:54:41  
PLUS PHENANTHRENE-D10  
100% = 27054

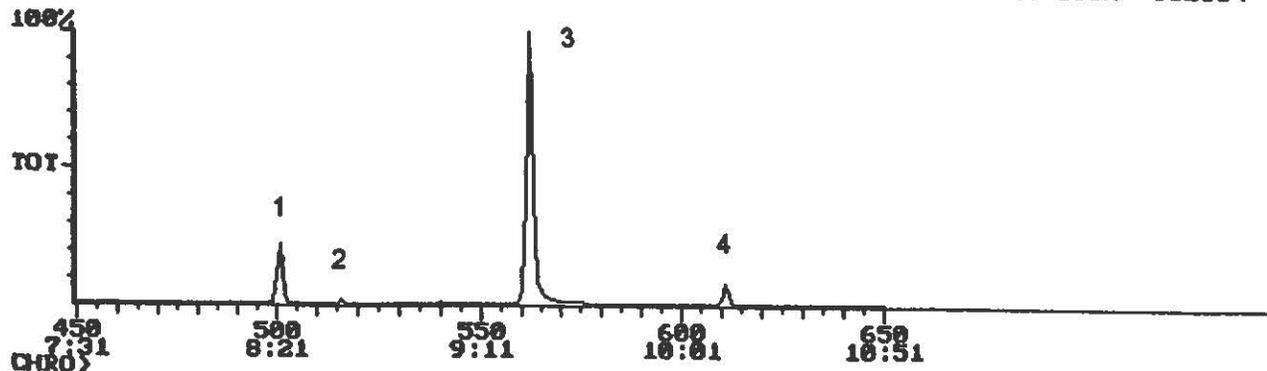


**FIGURE 31.** Analyse de la phase étherée obtenue de l'extraction de zones d'éclaircissement autour de colonies de *Pseudomonas* sp. 6 sur géloses TSA recouvertes de naphthalène pulvérisé.

[A] Haut, chromatogramme, Bas, fragmentogrammes de deux métabolites présumés.

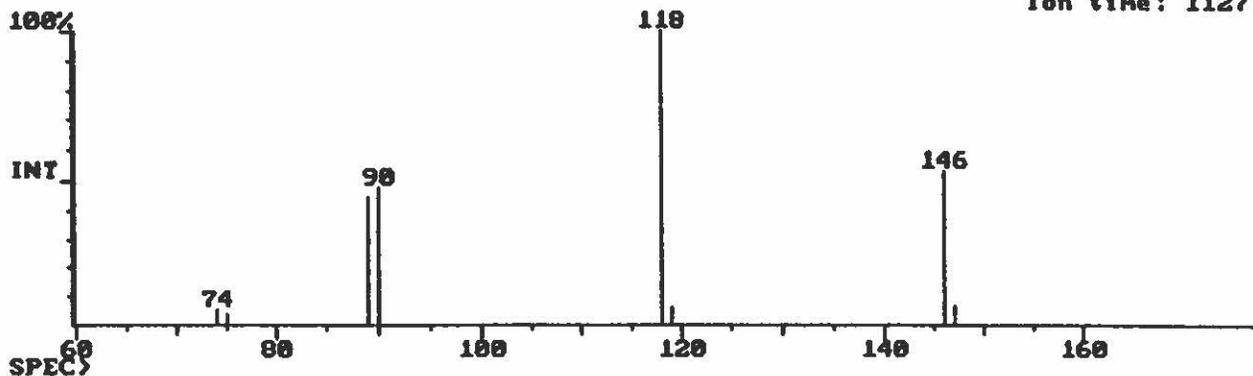
[B] Fragmentogrammes du coumarin et du dihydrocoumarin.

Chromatogram B:ED6NAPY Acquired: Jun-06-1994 11:32:26  
 Comment: EXTRACTION A L'ETHER DE GELOSE NAP SOUCHE 6JTB JAUNE  
 Scan Range: 450 - 650 Scan: 540 Int = 1672 @ 9:01 RIC: 100% = 362834



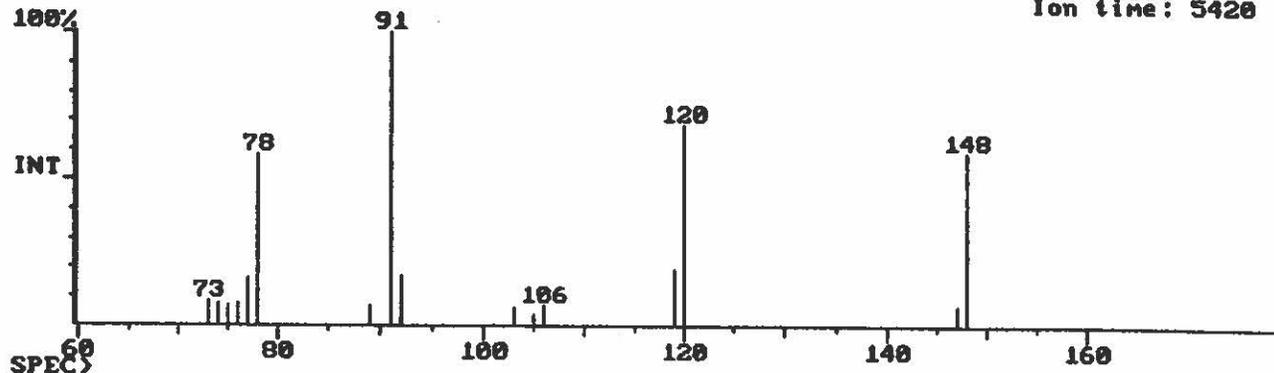
Métabolite 2 Coumarin

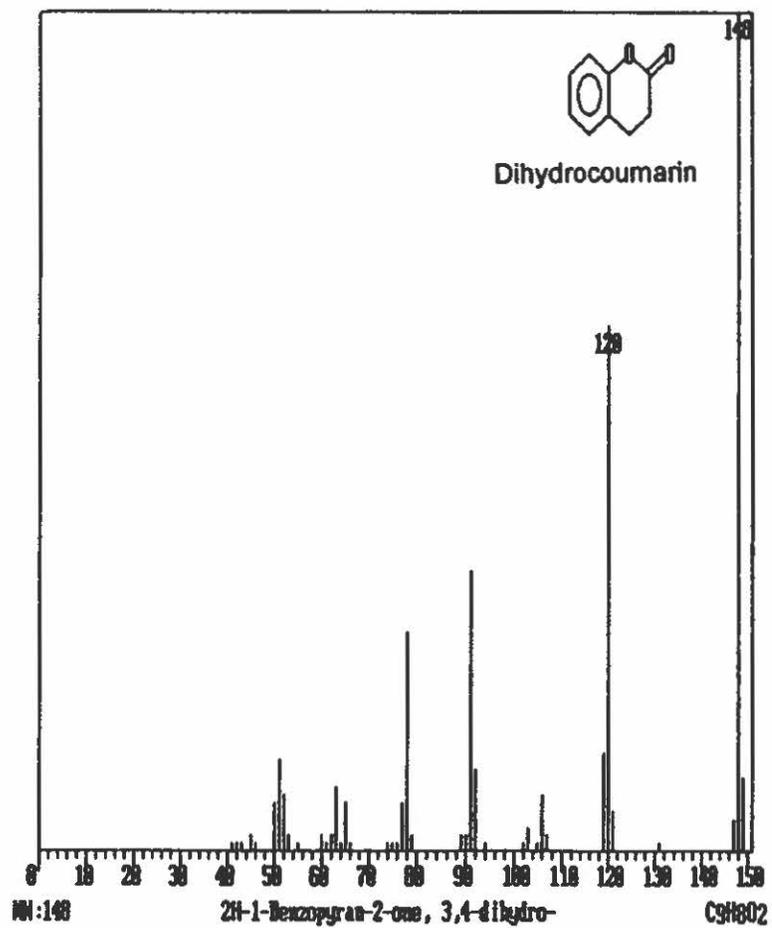
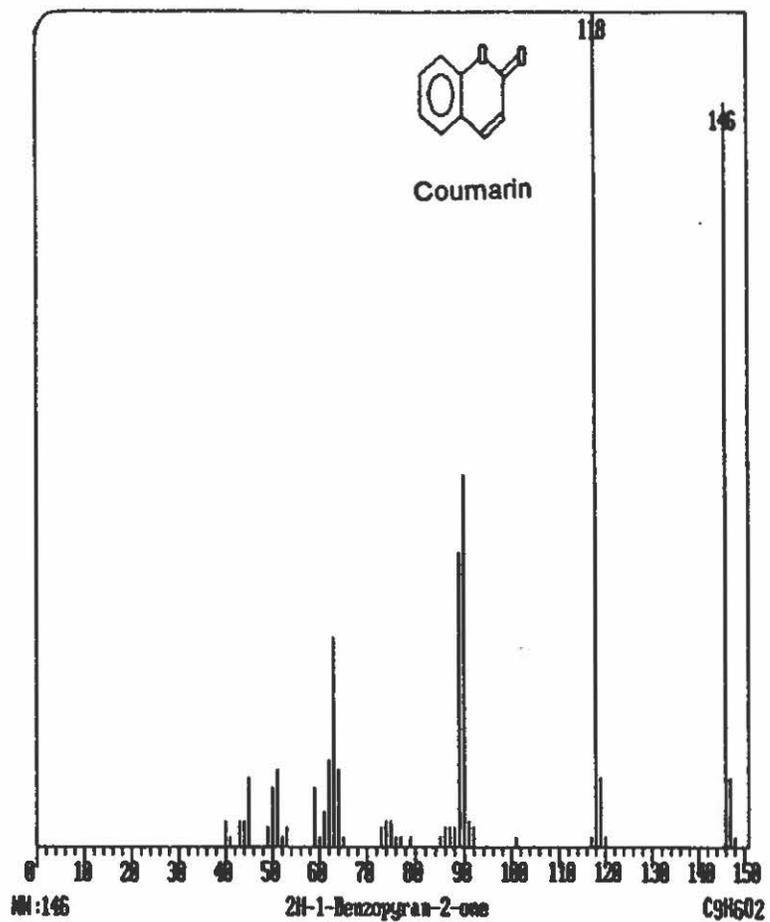
Spectrum # 564 B:ED6NAPY Acquired: Jun-06-1994 11:32:26 + 9:2  
 Comment: EXTRACTION A L'ETHER DE GELOSE NAP SOUCHE 6JTB JAUNE  
 Base Pk: 118 Int: 12003 Range: 74 - 147 RIC: 32641 100.00% = 12003  
 Ion time: 1127



Métabolite 3 Dihydrocoumarin

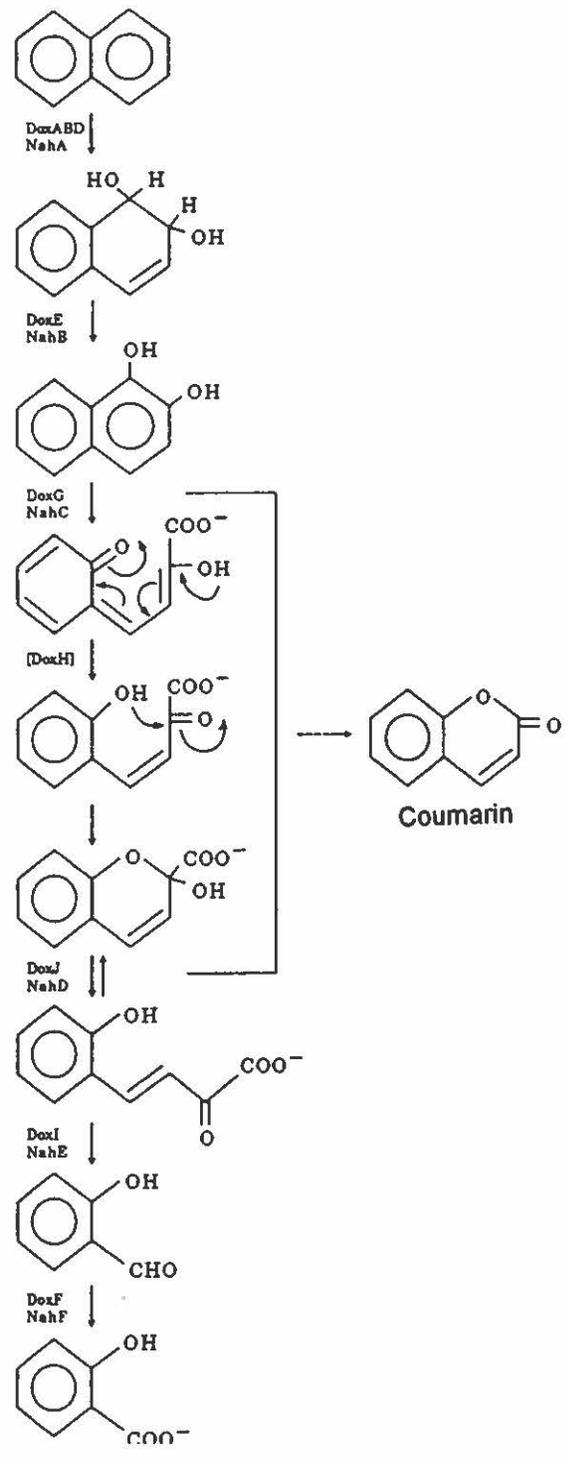
Spectrum # 516 A:ED6NAPY Acquired: Jun-06-1994 11:32:26 + 8:3  
 Comment: EXTRACTION A L'ETHER DE GELOSE NAP SOUCHE 6JTB JAUNE  
 Base Pk: 91 Int: 1500 Range: 73 - 148 RIC: 6125 100.00% = 1500  
 Ion time: 5420





**FIGURE 32.** Voie catabolique du naphthalène proposée par Denome et al. (1993).

# Naphtalène



# Salicylate



Lors d'une expérience au cours de laquelle la souche *Ps. aeruginosa* 19R a été cultivée en BH avec 100 ppm de salicylate de sodium et 100 ppm de fluorène, le pigment jaune brillant caractéristique s'était accumulé dans le milieu de culture. Suite à une extraction acide à l'éther diéthylique, un métabolite, vraisemblablement le 9-fluorénol, a été identifié (Figure 33). Grifoll et al., 1992 ont également rapporté l'accumulation de ce sous-produit lors de la biodégradation du fluorène.

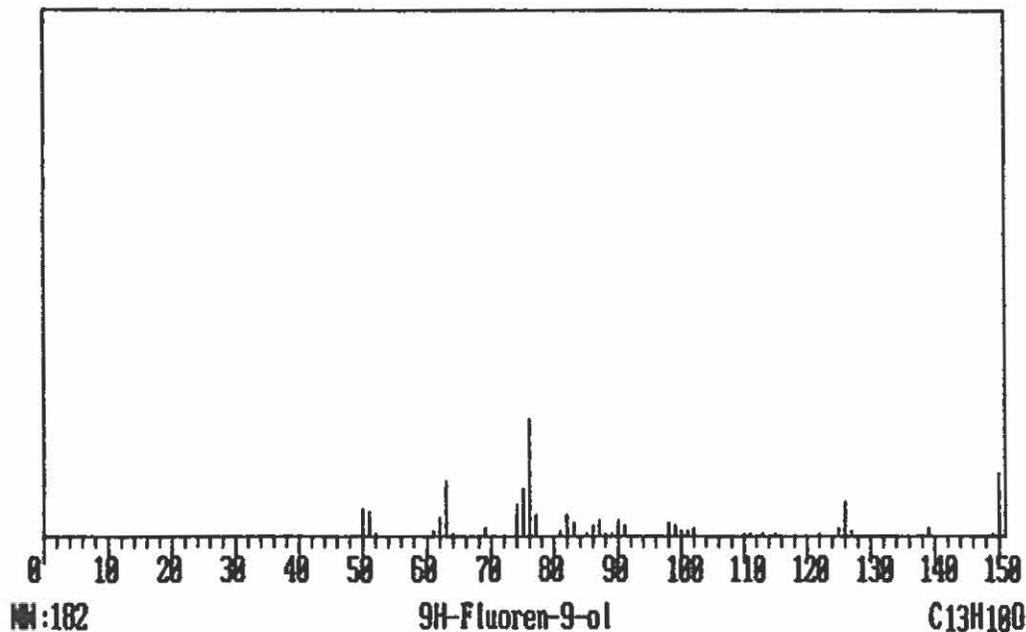
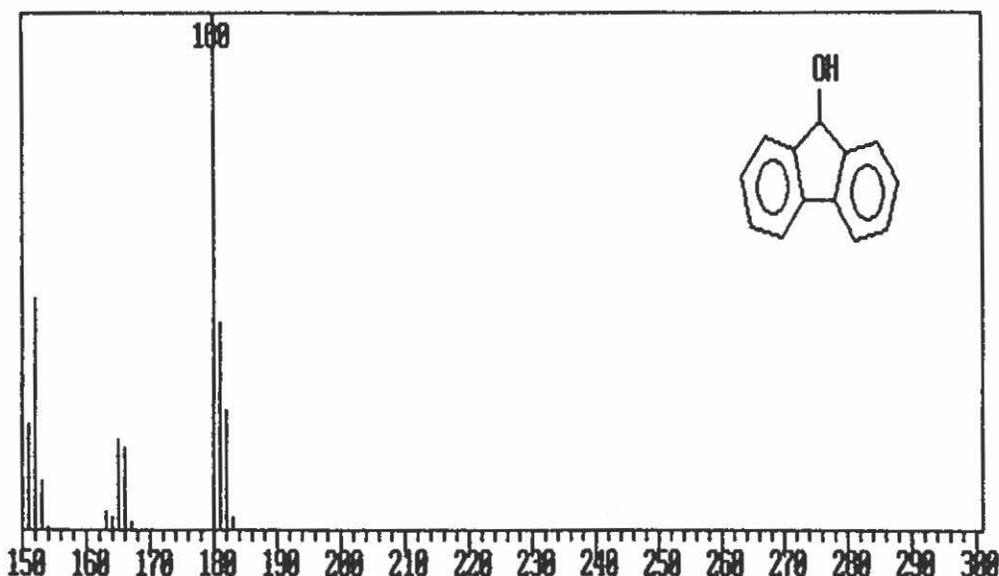
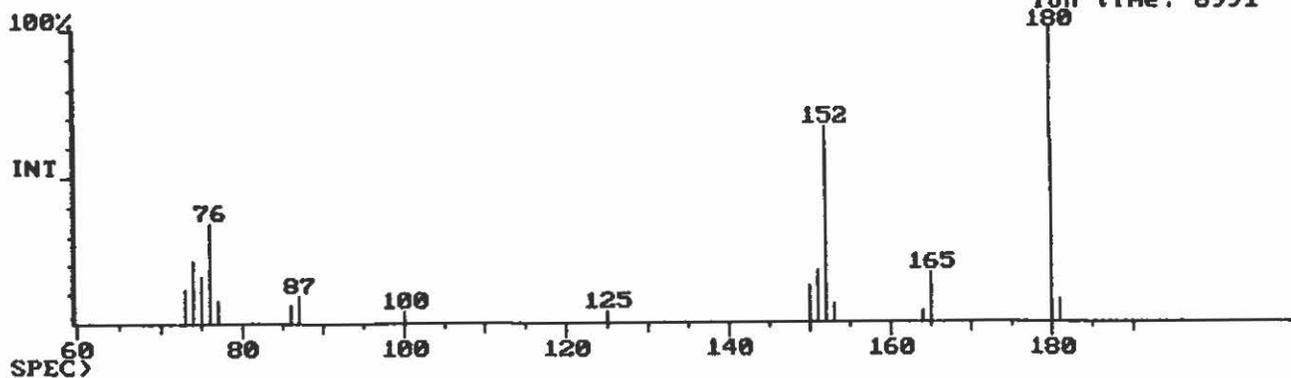
*Sphingomonas yanoikuyae* BDP 107 a été cultivée en BHY additionné de 200 ppm Tween 80 et 100 ppm fluoranthène. Après quatre jours d'incubation à 23°C et 150 rpm, le milieu de culture d'une coloration orangée foncée a été acidifié et extrait à l'éther diéthylique. La phase étherée a été concentrée et traitée au BSTFA, puis analysée au GC-MS. Le 9-fluorénone-1-carboxylate, un sous-produit présumé de la biodégradation du fluoranthène ayant déjà été rapporté (Kelley et al., 1991), a été identifié (Figure 34).

Comme mentionné précédemment, l'analyse d'une extrait organique de cultures des souches *Sphingomonas* BDP 105 et 107 en BH avec benz[a]anthracène a permis d'identifier ce qui serait un des intermédiaires déjà décrit par Mahaffey et al. (1988) (Figure 35). Ce métabolite pourrait correspondre à l'acide 1-hydroxy-2-anthranique, l'isomère principale (73%) qu'ils ont isolé (Figure 36).

Ces résultats indiquent que les caractéristiques cataboliques de nos souches confirment celles rapportées dans la littérature.

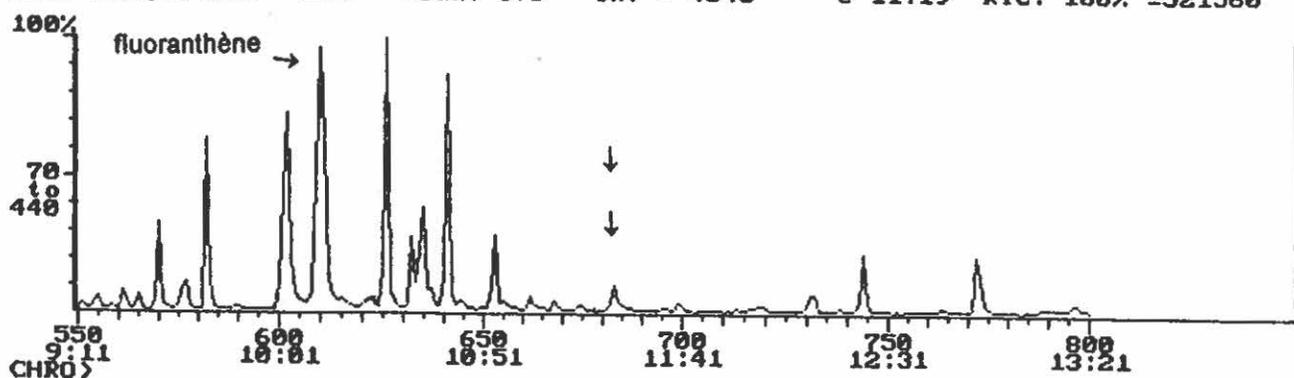
**FIGURE 33.** Fragmentogramme d'un métabolite présumé de la dégradation du fluorène par *Ps. aeruginosa* 19R, le 9-fluorénol.

Spectrum # 785 A:19RFLUFP Acquired: Jul-26-1994 14:25:33 + 13:0  
 Comment: SOUCHE QUI DEGRADE LE FLUORENE  
 Base Pk: 180 Int: 1039 Range: 73 - 181 RIC: 3677 100.00% = 1039  
 Ion time: 8991

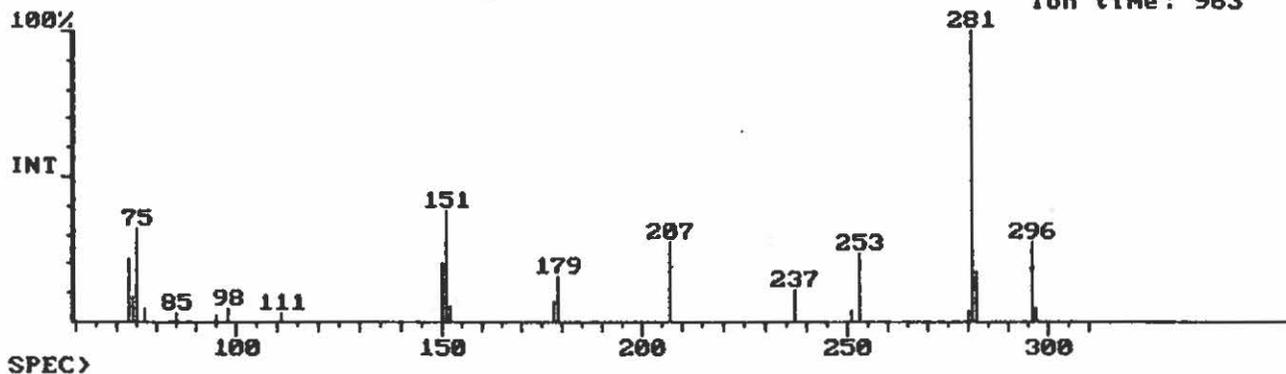


**FIGURE 34.** Analyse par chromatographie en phase gazeuse d'un échantillon d'éther concentré obtenu de l'extraction d'une culture de la souche BDP 107 en BHY avec 200 ppm de Tween 80 et 100 ppm de fluoranthène. Dérivation avec BSTFA. En bas, fragmentogramme et structure du métabolite présumé de la biodégradation du fluoranthène.

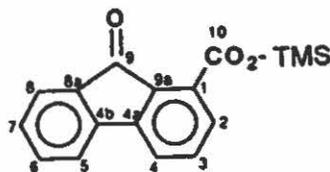
Chromatogram a:ED 10761 Acquired: May-08-1995 15:37:27  
 Comment: ED BHV 107(6)+TW80 FLA EXT. BAS. EXT. ACIDE BSTFA  
 Scan Range: 550 - 800 Scan: 678 Int = 4343 @ 11:19 RIC: 100% =521560



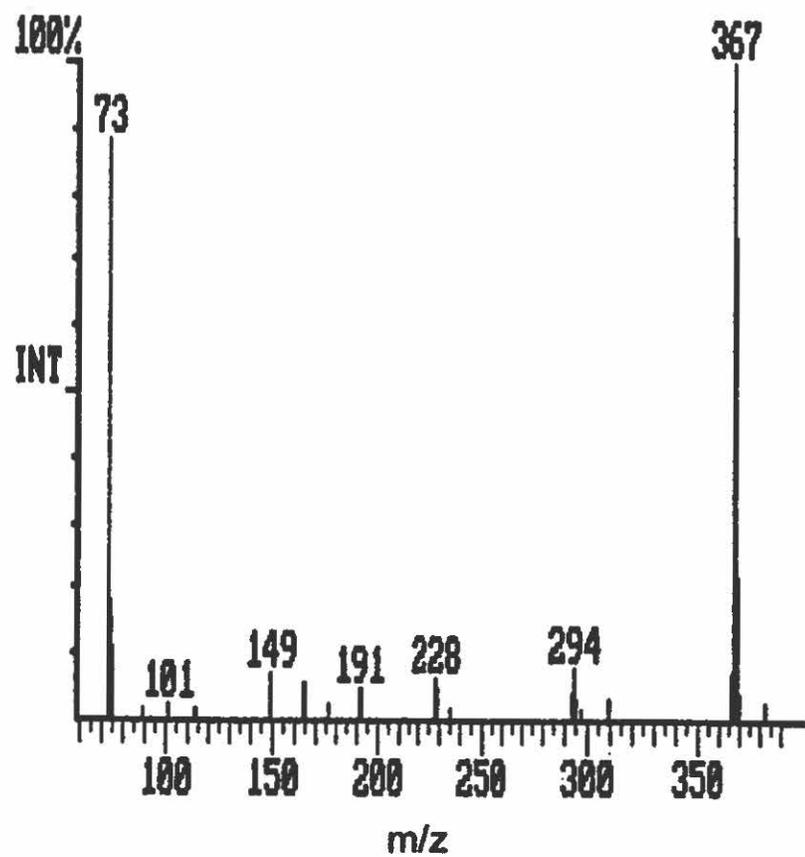
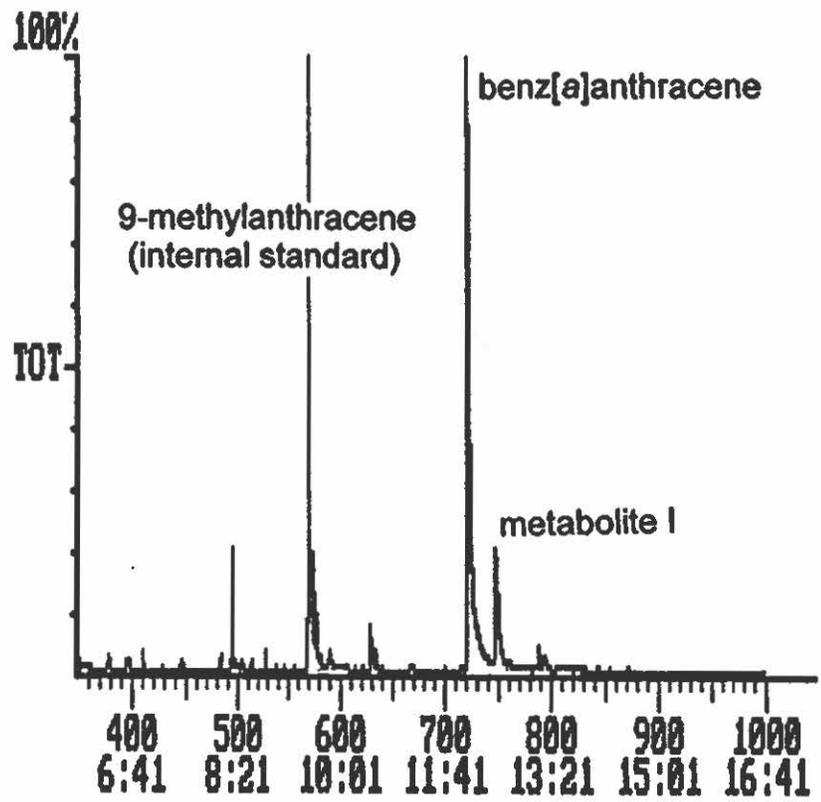
Spectrum # 683 a:ED 10761 Acquired: May-08-1995 15:37:27 + 11:2  
 Comment: ED BHV 107(6)+TW80 FLA EXT. BAS. EXT. ACIDE BSTFA  
 Base Pk: 281 Int: 13816 Range: 73 - 297 RIC: 54566 100.00% = 13816  
 Ion time: 963



TMS-9-fluorénone-1-carboxylate



**FIGURE 35.** Analyse par chromatographie en phase gazeuse d'un échantillon d'éther concentré obtenu de l'extraction d'une culture de la souche BDP 107 en BHY avec 200 ppm de benz[a]anthracène. Dérivation avec BSTFA. En bas, fragmentogramme du métabolite présumé de la biodégradation du benz[a]anthracène.



x

**FIGURE 36.** Voie métabolique du benz[a]anthracène de *Beijerinckia* (*Sphingomonas yanoikuyae*)

B1, proposée par Mahaffey et al. (1988).

