

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE  
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À  
L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
À L'OBTENTION DE LA  
MAÎTRISE AVEC MÉMOIRE EN GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT  
M. Sc. A.

PAR  
Madjiguène Lalaïssa Oumarou DIAKITÉ

TRAITEMENT DES EAUX USÉES MUNICIPALES PAR *PHANEROCHAETE*  
*CHRYSOSPORIUM*

MONTRÉAL, LE 22 NOVEMBRE 2016

©Tous droits réservés, Madjiguène Lalaïssa Oumarou DIAKITÉ, 2016

©Tous droits réservés

Cette licence signifie qu'il est interdit de reproduire, d'enregistrer ou de diffuser en tout ou en partie, le présent document. Le lecteur qui désire imprimer ou conserver sur un autre media une partie importante de ce document, doit obligatoirement en demander l'autorisation à l'auteur.

**PRÉSENTATION DU JURY**

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

M. Robert Hausler, ing., Ph.D, directeur de mémoire  
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Fausto Errico, ing., Ph.D, président du jury, président du jury  
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Frédéric Monette, ing., Ph.D, membre du jury  
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 25 OCTOBRE 2016

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant, le miséricordieux qui m'a donné la force et la santé pour mener à bien l'élaboration de ce mémoire.

Je voudrais aussi exprimer toute mon entière reconnaissance à mon directeur Robert Hausler, pour m'avoir encadré, guidé et fait part de ses réflexions et connaissances. Vos conseils prodigués et vos encouragements m'ont permis d'être plus forte et d'avoir plus confiance en moi et en mes capacités.

Mes parents, pour avoir cru en moi, me motiver, m'encourager, me pousser à aller au delà de mes limites et qui m'ont donné les moyens d'aller au bout de mes rêves.

De même j'aimerai exprimer mes sentiments de respects et ma profonde gratitude à Michael Dubois, pour sa patience, son amabilité et pour tous les conseils, informations et mots d'encouragements prodigués.

J'aimerai également remercier Christine Richard pour l'aide apportée lors de la rédaction de ce mémoire.

Enfin, un gros merci à mon conjoint qui a témoigné un soutien inébranlable, à fait preuve de patience et d'écoute ainsi que toutes celles et ceux qui ont marqué d'une manière ou d'une autre leur participation à la réalisation de ce projet.

Merci...



# TRAITEMENT DES EAUX USÉES MUNICIPALES PAR *P.CHRYSPORIUM*

Madjiguène Lalaïssa Oumarou DIAKITÉ

## RÉSUMÉ

La présence de nombreux micropolluants récalcitrants identifiés dans les rejets d'effluents cause des préoccupations de plus en plus croissantes. Bien qu'il existe diverses méthodes de traitements, celles-ci sont cependant économiquement pas viables. C'est dans ce cadre que s'inscrit cette présente étude dont le but est de développer une stratégie biotechnologique (mycoremédiation) économiquement viable, écologique et efficace afin d'assurer l'assainissement des eaux usées domestiques ainsi que l'élimination de ces micropolluants. Cette technique relativement récente consiste à exploiter la capacité de certains champignons à dégrader une large gamme de polluants grâce aux enzymes qu'elles sécrètent. Dans la présente étude, le champignon de la pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium* a été utilisé pour la fabrication de greffons afin de produire une qualité d'effluents acceptable avant leur rejet dans le milieu récepteur.

La première partie du protocole expérimental a consisté à cultiver *Phanerochaete chrysosporium* sur divers support de formes et de matières différentes. Le polyuréthane et le polyéthylène ont accusé une meilleure croissance. Cependant, le choix s'est porté sur les pastilles de Dégremont, car le polyuréthane et le polyéthylène étaient trop volumineux. La seconde partie a évalué l'efficacité du traitement fongique sur une eau usée municipale au moyen de différents tests (DCO, DBO<sub>5</sub>, MES, Phosphore, Azote etc.) et sous différentes conditions de cultures (pH, température etc.). Il ressort au terme des expériences que les milieux traités avec les greffons présentent une meilleure qualité que les milieux traités uniquement avec *Phanérochaete chrysosporium*. La troisième partie de l'étude a porté sur la quantification de la production enzymatique (MnP et LiP) avec et sans support afin d'observer l'effet du support sur cette production. Les résultats indiquent des abattements de DCO et de DBO<sub>5</sub> de 98 % et 97 % respectivement. Une diminution des MES de 44% est également observée. Les résultats montrent également que les greffons de pastilles de Dégremont amélioreraient la production enzymatique et qu'ils auraient également la capacité de s'opposer à la variation de pH. Le criblage permettant de déterminer les limites du procédé indique que 50 à 75 greffons, un pH de 4,5 à 5,5 et une température de 25°C à 35°C sont nécessaires pour un meilleur traitement fongique. Au delà et en dessous de ces valeurs, le traitement n'est plus aussi efficace.

**Mots clés :** assainissement, eaux usées municipales, mycorémédiation, *Phanerochaete chrysosporium*, fixation, enzymes ligninolytiques.





## MUNICIPAL WASTEWATER TREATMENT BY *P. CHRYSOSPORIUM*

Madjiguène Lalaïssa Oumarou DIAKITÉ

### ABSTRACT

The presence of many recalcitrant micro-pollutants identified in the effluent discharge because of concerns increasingly growing. Although there are various methods of treatment, those are not economically viable. In this context, this article aimed to develop a biotechnology strategy (mycoremediation) economically viable, environmentally friendly and efficient to ensure sanitation for domestic wastewater and removal of micropollutants. This relatively new technique focus on the ability of fungi to degrade a wide range of pollutants through the enzymes they secrete. In this study, the fungus white rot *Phanerochaete chrysosporium* was used for the manufacture of grafts to produce an acceptable quality of effluent prior to discharge into the receiving environment.

The first part of the experimental protocol was to cultivate *Phanerochaete chrysosporium* on several media of different shapes and materials. Polyurethane and polyethylene showed a better growth. However, the choice fell on the pellets of Degremont because polyurethane and polyethylene were too large. The second part has analyzed the fungus treatment effectiveness on wastewaters through several tests (COD, BOD<sub>5</sub>, TSS, Phosphorus, nitrogen etc.) and under different culture conditions (pH, temperature etc.). It appears at the end of this experience that the treated areas with grafts show a better quality than the treated areas only with *Phanerochaete chrysosporium*. The third part focused on quantifying the enzymatic production (MnP and LiP) with and without carrier to observe the effect of the media on this production. The results indicate a reduction of COD and BOD<sub>5</sub> respectively 98 % and 97 % and lower 44 % TSS is also observed. These results also indicate that the pellets would improve the enzyme production and they also have the ability to oppose the change in pH. Screening to determine the limits of the process indicates that 50 to 75 grafts, pH 4.5 to 5.5 and a temperature of 25 ° C to 35 ° C are necessary for a better fungal treatment. Above and below these numbers, the treatment was not as effective.

**Keywords:** drainage, municipal sewage, mycoremediation, *Phanerochaete chrysosporium*, fixation, white rot enzymes.



## TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	5
1.1 Assainissement des eaux usées au Québec .....	5
1.2 Problèmes environnementaux .....	6
1.2.1 Écotoxicité des effluents municipaux .....	6
1.2.2 Évaluation de l'écotoxicité des effluents municipaux .....	7
1.2.3 Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées .....	8
1.2.3.1 Réglementation provinciale québécoise .....	8
1.2.3.2 Réglementation fédérale .....	9
1.2.4 Mycorémédiation : une forme de biorémédiation .....	10
1.2.5 Principaux mécanismes de la mycorémédiation .....	11
1.2.5.1 Processus de mycoremédiation dans l'environnement .....	13
1.2.5.2 Concept de la mycorémédiation des eaux usées : technique des biofiltres .....	14
1.3 Mycoremédiation avec <i>Phanérochaete chrysosporium</i> .....	15
1.3.1 Conditions de cultures adéquates pour la culture du champignon <i>P. chrysosporium</i> .....	16
1.4 Description et localisation du champignon <i>P. chrysosporium</i> .....	17
1.4.1 Structure et mécanisme de biodégradation de la lignine .....	18
1.4.2 Mécanisme d'action des enzymes peroxydases .....	19
1.4.2.1 Lignine-peroxydases .....	20
1.4.2.2 Manganèse-peroxydases .....	21
1.4.2.3 Laccases .....	23
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE .....	25
2.1 Activation du champignon sur milieu solide .....	25
2.2 Essais de greffage fongiques sur biomatériaux .....	26
2.2.1 Calibrage des matériaux .....	26
2.2.2 Préparation du milieu de culture liquide fongique .....	28
2.2.3 Procédure d'immobilisation .....	29
2.2.4 Estimation de la biomasse fongique .....	30
2.3 Description du site d'étude .....	30
2.4 Procédure expérimentale de l'optimisation du traitement .....	32
2.4.1 Effets du support sur le traitement fongique .....	32
2.4.2 Effet de la quantité de greffons sur le traitement fongique .....	33
2.4.3 Effet du pH sur le traitement fongique .....	34
2.4.4 Effet de la température d'incubation sur le traitement fongique .....	34
2.4.5 Effet de la concentration en glucose .....	34
2.5 Effet de la source d'azote et de la concentration en azote .....	35
2.5.1 Effet de la source d'azote .....	35
2.5.2 Effet de la concentration en azote .....	35
2.6 Effet des médiateurs .....	35

2.7	Étude de la production enzymatique.....	36
2.8	Évaluation du traitement fongique.....	36
2.8.1	Détermination du pourcentage de décoloration de l'eau.....	36
2.8.2	Méthodes analytiques.....	37
CHAPITRE 3 RÉSULTATS .....		39
3.1	Biomasse fongique.....	39
3.2	Effets du support sur le traitement fongique et sur la production enzymatique .....	41
3.2.1	Effets du support sur le traitement fongique.....	42
3.2.2	Quantification de la production enzymatique .....	44
3.3	Résultats de l'optimisation du traitement fongique .....	46
3.3.1	Effet de la quantité de greffons sur le traitement fongique.....	46
3.3.2	Effet du pH sur le traitement fongique.....	49
3.3.3	L'effet de la température sur le traitement fongique.....	51
3.4	Effet de la concentration en glucose, en azote et des médiateurs .....	52
CHAPITRE 4 DISCUSSION .....		57
4.1	Contributions de la recherche .....	57
4.1.1	Avantage de greffer <i>P. chrysosporium</i> sur biomatériaux .....	57
4.2	Paramètres physiologiques influençant l'efficacité du traitement.....	58
4.2.1	Quantité de greffons.....	58
4.2.2	pH .....	59
4.2.3	La température .....	61
4.3	Effet de l'apport nutritionnel sur le traitement fongique. ....	61
4.3.1	Glucose.....	61
4.3.2	Azote.....	62
4.3.3	Médiateurs.....	63
4.4	Évaluation de l'efficacité du traitement fongique par <i>P. chrysosporium</i> .....	64
4.4.1	Estimation de la biomasse fongique après traitement.....	64
4.4.2	Caractéristiques de l'eau usée traitée .....	65
CONCLUSION.....		69
ANNEXE I	COMPOSITION DU MILIEU BASAL III ET DES ÉLÉMENTS EN TRACES .....	71
ANNEXE II	PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PEROXYDASE DE LA LIGNINE.....	73
ANNEXE III	PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PEROXIDASE DE MANGANESE.....	77
ANNEXE IV	DÉGRADATION DU PAPIER D'ALUMINIUM PAR <i>P. CHRYOSPORIUM</i> .....	79

ANNEXE V      COURBE D'ÉTALLONAGE POUR LE TEST DE PHOSPHORE.....80  
LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....81

**LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1.1	Comparaison entre les différents mécanismes : biosorption, bioaccumulation, biodégradation.....	12
Tableau 2.1	Composition du milieu de culture fongique solide.....	26
Tableau 2.2	Composition du milieu de culture fongique liquide.....	29
Tableau 2.3	Caractéristiques moyennes des eaux usées brute de La Prairie.....	32
Tableau 2.4	Matériel et méthodes utilisées pour effectuer les tests en laboratoire.....	38
Tableau 3.1	Variation du pH en fonction du nombre de greffons après 6 jours de culture et à température ambiante.....	48
Tableau 3.2	Effet de la variation du pH sur le traitement fongique après 6 jours et à température ambiante.....	50
Tableau 3.3	Effet de la variation du pH sur les quantités MES et MVES après 6 jours de traitement et à température ambiante.....	50
Tableau 4.1	Comparaison entre l'eau usée traitée par les greffons et les normes de rejets réglementaires.....	65

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Modèle simplifié de l'action des champignons survenant naturellement et /ou de manière anthropogénique de dérivées organiques et inorganiques des substrats – .....	13
Figure 1.2	Composés phénoliques précurseurs de la lignine .....	19
Figure 1.3	Mécanisme catalytique de la LiP .....	21
Figure 1.4	Mécanisme catalytique de la MnP .....	22
Figure 2.1	Culture en milieu solide de <i>P. chrysosporium</i> .....	25
Figure 2.2	Forme initiale des matériaux.....	27
Figure 3.1	Greffons de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	39
Figure 3.2	Estimation du poids de la biomasse fongique adhérent aux supports.....	41
Figure 3.3	Valeur résiduelle de la DCO et de la DBO <sub>5</sub> en fonction de la variation du nombre de greffons après 6 jours de traitement et à température ambiante.....	47
Figure 3.4	Valeur résiduelle de la DCO suite à l'utilisation de 25 greffons en fonction du temps et à température ambiante.....	48
Figure 3.5	Valeur résiduelle de la DCO et de la DBO <sub>5</sub> en fonction de la variation de la température et après 6 jours traitement fongique.....	52
Figure 3.6	Comparaison entre la DCO avant et la DCO après 6 jours de traitement à température ambiante et en fonction de la concentration en glucose .....	53
Figure 3.7	Comparaison entre la DCO avant et la DCO après traitement fongique en fonction de la source en azote .....	54
Figure 3.8	Comparaison entre la DCO avant et la DCO après traitement fongique en fonction de la concentration en azote.....	54
Figure 3.9	Comparaison entre la DCO avant et la DCO après six jours traitement fongique en fonction de l'ajout de médiateurs et placé à température ambiante.....	55





## LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ABSFin	Absorbance finale
ABSini	Absorbance initiale
Aox	Substrat oxydé
Ared	Substrat réduit
AS	Avec support
Cu	Cuivre
CAS	Contrôle avec support
CSS	Contrôle sans support
DBO <sub>5</sub>	Demande biochimique en oxygène à 5 jours
DCO	Demande chimique en oxygène
COOH	Groupement hydroxyle
EUB	Eau usée brute
EUBM	Eau usée brute modifiée
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Molécule d'eau oxygénée
HRGP	Hydroxylprolin rich glyco protein
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Phosphate de potassium dibasique
LiP	Lignine peroxydases
MES	Matière en suspension
Mg	Atome de magnésium
MgSO <sub>4</sub>	Sulfate de magnésium
Mn	Atome de manganèse

## XVIII

Mn <sub>2+</sub>	Manganèse sous forme ionisée
Mn <sub>3+</sub>	Manganèse sous forme ionisée
MnP	Manganèse peroxydases
MnSO <sub>4</sub>	Sulfate de manganèse
MES	Matières en suspension
MVES	Matière volatile en suspension
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
P	Phosphore
PAEQ	Programme d'assainissement des eaux du Québec
PEP	Peptone
pH	Potentiel hydrogène
RAEBL	Régie d'assainissement des eaux du bassin de la prairie
SMEWW	Standards methods for the examination of water and wastewater
SS	Sans support
STEP	Station d'épuration
TA	Tartrate d'ammonium
VA	Vératryl alcool
VA <sup>++</sup>	Radical cationique
YE	Yeast extract

## LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
cm <sup>2</sup>	Centimètre carré
cm <sup>3</sup>	Centimètre cube
cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup>	Centimètre carré par centimètre cube
g	Gramme
g/L	Gramme par litre
g/g	Gramme par gramme
g/cm <sup>2</sup>	Gramme par centimètre carré
g/cm <sup>3</sup>	Gramme par centimètre cube
mg O <sub>2</sub> /L	Milligramme d'oxygène par litre
mg CaCO <sub>3</sub> /L	Milligramme de carbonate de calcium par litre
mg-N/L	Milligramme d'azote par litre
mg P-Po <sub>4</sub> /L	Milligramme de phosphore par litre
km	Kilomètre
L	Litre
mL	Millilitre
M	Molaire
mM	Millimolaire
mg	Milligramme
mg/L	Milligramme par litre
µm	Micromètre

XX

nm	Nanomètre
PtCo	Platinum cobalt
Po	Pouces
Rpm	Rotation par minute

## INTRODUCTION

Les eaux usées des habitations, des industries, des commerces et des institutions contiennent de nombreuses substances susceptibles de présenter des risques pour la santé humaine et l'environnement. Au Canada, plus de 150 milliards de litres d'eaux usées non traitées et insuffisamment traitées (eaux d'égouts) sont rejetés dans les cours d'eau chaque année (Environnement Canada, 2016). Les eaux usées domestiques, quant à elles, proviennent des cabinets d'aisance ainsi que des eaux ménagères (eaux de cuisine, de salle de bain, de buanderie et eaux générées par certains appareils d'usage domestique autres qu'un cabinet d'aisance) (MDDELCC, 2016a).

Les ouvrages municipaux sont en générale bien adaptés en ce qui concerne le traitement des rejets domestiques (Voloshyn, 2014). Cependant, dans le cas d'un réseau d'égout communautaire ou municipal, des rejets industriels peuvent être combinés aux rejets domestiques (Gouvernement du Québec), et il peut y avoir une non compatibilité de certains effluents industriels avec le traitement utilisé pour les rejets domestiques (Voloshyn, 2014). En raison de cette incompatibilité, les effluents industriels ne sont pas complètement traités. Par conséquent les composés chimiques synthétiques difficilement biodégradables, toxiques mutagènes et/ou cancérigènes issus de ces effluents peuvent se retrouver à tous les niveaux de la chaîne alimentaire lorsqu'ils sont déversés dans les milieux récepteurs (Hodgson, 1998). Il est donc nécessaire de trouver une alternative de traitement de ces rejets industriels. Les procédés de traitements actuels sont en grande partie basée sur les principes de la floculation avec de la chaux et du sulfate ferreux, l'adsorption sur charbon actif, d'osmose inverse de nanofiltration ou encore d'évaporation solaire (Singh et Tripathi, 2007). Mais en raison de leurs coûts de maintenances onéreuses, ces techniques ne sont pas économiquement viables.

En Amérique du nord, les traitements physicochimiques (alun, sulfate ferrique et chlorures ferriques) et les traitements aérobie par boues activées sont les moyens de traitements les plus populaires dans les stations d'épuration (STEP). Bien que biologique, les traitements

aérobies par boues activées génèrent des boues qu'il faut ensuite traiter. Leurs performances dépendent grandement de la capacité des boues à décanter et est aussi sensible aux surcharges hydrauliques. Ce procédé est énergivore, 40 à 60% est en moyenne destinée à l'aération des bassins de traitement (Chaisemartin, 2005). Par conséquent, il est nécessaire de chercher des technologies écologiques et appropriées. Ces dernières années, d'innombrables applications biotechnologiques ont émergé telle que la bioremédiation qui pourrait permettre un traitement des eaux usées ne présentant pas tous ces inconvénients. Elle consiste à utiliser des micro-organismes généralement des bactéries ou des champignons pour éliminer les polluants du sol et de l'eau. Bien que les bactéries ne dégradent généralement qu'un seul type de polluant spécifique et requièrent une plus longue durée que les champignons pour les dégrader, leur rôle est cependant extrêmement important dans le processus de la bioremédiation. Les champignons ont également un rôle potentiellement important en particulier ceux de la pourriture blanche qui ont la capacité de dégrader un plus large éventail de polluants (Gao et al., 2010), c'est pour cette raison que l'intérêt s'est porté sur le champignon *P. Chrysosporium*. Isolé au début des années 70, ce champignon, s'est révélé capable de dégrader une large gamme de composés récalcitrants (PCB, le pentachlorophénol, les colorants issus des industries textiles, des pesticides etc.) de part sa polyvalence et de part ses capacités oxydatives (Hodgson, 1998).

L'objectif principal des présents travaux consiste à évaluer l'efficacité du traitement fongique à dégrader la matière organique en passant par différents tests (DCO, DBO<sub>5</sub>, azote ammoniacal, MES, phosphore etc.). Les objectifs spécifiques sont les suivants :

- vérifier la capacité de *Phanerochaete chrysosporium* à adhérer à différents types de supports, de matières et de formes différentes afin de déterminer sur lequel il se fixe le mieux;
- effectuer des variations des différents paramètres physiologiques à savoir principalement, la quantité de greffons, le pH et la température qui assurent un meilleur traitement afin de déterminer les limites d'action du présent procédé. Les effets des additifs (médiateurs), de la concentration en glucose ainsi que celle de la source et de la concentration en azote ont également été étudiés ;

- étudier l'effet du support sur la production enzymatique à 0,1% et à 1% de glucose.

Afin d'atteindre ces objectifs, le premier chapitre exposera l'état des connaissances sur la situation des eaux usées traitées des STEP au Québec, leur impact sur l'environnement, la réglementation s'y rattachant ainsi que l'exploitation de la mycorémédiation comme solution envisagée pour traiter plus efficacement les eaux usées municipales. Le second chapitre décrit le matériel et les méthodes utilisées. Le troisième chapitre porte sur les différents résultats obtenus lors des essais expérimentaux. Le quatrième chapitre montre le caractère significatif des résultats obtenus et enfin une conclusion complètera le document ainsi que les différentes avenues de recherche proposées.





## CHAPITRE 1

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

La première partie de ce chapitre expose l'état des eaux usées traitées des STEP au Québec ainsi que les normes de rejets applicables selon le règlement provincial et fédéral. La deuxième partie présente le concept de la mycoremédiation, l'exploitation du principe de la mycoremédiation ainsi que ses limites actuelles. La troisième partie porte sur la description du champignon *Phanerochaete chrysosporium*, les principaux enzymes qu'il produit ainsi l'analogie de structure qui existe entre les enzymes qu'il produit et les micropolluants.

#### 1.1 Assainissement des eaux usées au Québec

Afin de préserver l'environnement et de conserver la qualité des eaux, le gouvernement du Québec a élaboré en 1978 un programme gouvernemental, le Programme d'assainissement des eaux du Québec (PAEQ) (MDDELCC, 2016a). Suite à ce programme, l'agglomération de Montréal s'est dotée d'un réseau d'interception des eaux usées et d'une station d'épuration afin de traiter ses eaux usées avant leur rejet dans le milieu récepteur.

La station d'épuration de Montréal traite environ 45 % du volume total des eaux usées de la province du Québec et a été conçue principalement pour réduire les concentrations en matières en suspension (MES), en phosphore (P) et en demande chimique en oxygène (DCO). Cependant, suite à la croissance démographique et au développement des industries, un quart de ses eaux usées à traiter est constitué d'eaux usées provenant d'entreprises diverses (Ville de Montréal, 2016). Le système de traitement de la station d'épuration n'étant pas vraiment adapté pour traiter ce type d'effluents pouvant contenir divers contaminants, tels que les métaux lourds, des détergents, des pesticides ou encore des hormones, ces éléments se retrouvent mal éliminés et le traitement de ces rejets est par conséquent incomplet. Des traitements complémentaires sont donc nécessaires afin de réduire l'apport de ces micropolluants dans les eaux de surface (Vargas, 2013). De plus, les basses températures

rencontrées durant la saison hivernale rendent les eaux froides, ce qui contribue à diminuer le rendement des stations d'épurations usant de traitements biologiques (Petit, 2012). Les conséquences de ces rendements non satisfaisantes contribuent à un apport excessif en phosphore et en composés azotés. En effet, Montréal et Québec figuraient respectivement au 3<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> rang d'un classement établissant les cinquante pires pollueurs de l'eau et cela en raison de leur taux élevé de rejet en phosphore et en azote (Knights, 2006). D'après les données de l'Inventaire national des rejets de polluants (INRP) les rejets d'ammoniac total étaient de 4807 tonnes/ an pour la STEP de la ville de Montréal et de 1490 tonnes/ an pour les STEP de la ville de Québec est et ouest confondus (INRP, 2005a) Les rejets de phosphore enregistrés étaient de 471 tonnes/ an pour la STEP de Montréal et de 192 tonnes/ an pour les STEP de la ville de Québec est et ouest confondus (INRP, 2005b). Ces composés, présents en trop grande quantité contribuent à accentuer les phénomènes d'eutrophisation et de toxicité chronique, voire même aigüe sur les organismes présents dans les milieux aquatiques.

## **1.2 Problèmes environnementaux**

Les dangers que présente le mélange de micropolluants contenu dans les eaux usées traitées des STEP et rejetés dans les milieux récepteurs sont encore peu connus pour la faune et la flore. Cependant, l'évaluation de l'écotoxicité d'un composé donné que peuvent contenir les eaux usées traitées des STEP peut donner une idée sur les dangers que peut représenter le mélange de ces micropolluants.

### **1.2.1 Écotoxicité des effluents municipaux**

Les substances toxiques rejetées dans l'environnement ont des effets nocifs sur la santé humaine, la faune et la diversité biologique (Environnement Canada, 2016) et les eaux usées non domestiques contiennent généralement des métaux lourds et des substances chimiques synthétiques qui les rendent toxiques. Par exemple, les métaux toxiques peuvent être inhalés ou se déposer sur les sols et dans l'eau, et à partir de là, ils peuvent pénétrer dans la chaîne alimentaire et s'accumuler dans les tissus des organismes vivants (Environnement Canada, 2016). Par ailleurs, la transformation de certaines molécules peut survenir lors de réactions

chimiques produites lorsqu'elles sont en contact avec les eaux usées. Une utilisation abondante et un déversement des produits d'entretien, des médicaments et d'autres produits toxiques dans les égouts par les hôpitaux et les laboratoires de recherches peuvent également conférer une certaine toxicité aux eaux usées. Cependant, les effluents domestiques peuvent contenir ces mêmes éléments toxiques (Voloshyn, 2014). Une étude effectuée sur les rivières du Canada a démontré l'effet des eaux traitées des STEP à induire la féminisation des organismes aquatiques, de par la présence en éthinyloestradiol (molécule utilisée dans la fabrication de contraceptifs hormonaux). Les données récoltées en amont et en aval des STEP ont montré une augmentation considérable des femelles allant de 30 % en amont contre 80 % en aval (Vargas, 2013). Aujourd'hui, rien ou presque rien n'est établi en ce qui concerne les propriétés écotoxicologiques que présente le mélange de micropolluants dans les eaux usées (Keil, 2008).

### **1.2.2 Évaluation de l'écotoxicité des effluents municipaux**

Les paramètres génériques tels que la demande biologique en oxygène (DBO), les matières en suspension (MES) et le potentiel hydrogène (pH) donnent une idée générale de la contamination d'une eau, mais ne permettent aucunement d'évaluer la toxicité des eaux usées (Voloshyn, 2014). Il est nécessaire pour les stations d'épurations optant pour un traitement biologique d'analyser la toxicité de l'affluent pour protéger les microorganismes qui épurent l'eau. Des tests peuvent directement être réalisés dans les boues activées ou encore à l'entrée du procédé de traitement biologique. Parmi les méthodes proposées, l'inhibition de la respiration des bactéries, l'inhibition de la nitrification ainsi que la bioluminescence peuvent être cités. Pour la protection de l'environnement, des tests sont également effectués sur l'effluent à la sortie de la station d'épuration afin d'en évaluer sa toxicité. Ces tests sont généralement effectués sur des bactéries, des daphnés et des poissons. Des biocapteurs ont légalement été développés et permettent de faire le suivi de la toxicité. Ils peuvent être inclus dans l'équipement de surveillance des stations d'épuration (Voloshyn, 2014).

### **1.2.3 Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées**

Il existe deux types de réglementation : la réglementation québécoise et la réglementation fédérale. Ces deux règlements ont été élaborés séparément, selon des approches et des contextes législatifs différents et découlent tous les deux de la stratégie pancanadienne. La différence entre la réglementation québécoise et la réglementation fédérale est que la réglementation fédérale impose une norme relative au chlore résiduel total et à l'azote ammoniacal (ammoniac non ionisé). La réglementation fédérale établit également les normes technologiques de base, applicables à tous les ouvrages d'assainissement dont le débit journalier moyen supérieur à 100 m<sup>3</sup>. Cependant, elle ne contient pas de normes de débordement d'eaux usées non traitées. Le soin de l'application des exigences a été laissé aux provinces (MDDELCC, 2016c).

#### **1.2.3.1 Réglementation provinciale québécoise**

Selon la taille des stations d'épuration, tout exploitant d'une station d'épuration doit impérativement effectuer des échantillonnages de son effluent afin de les analyser suivant la procédure décrite dans l'annexe I du Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées et cela selon la fréquence définit dans cette même annexe.

- Des rapports périodiques doivent être envoyés au ministère et des registres des contrôles effectués doivent être tenus sur place. Des sanctions sont prévues aux personnes physiques et juridiques qui enfreignent le respect du dit règlement. Ces sanctions sont les sanctions administratives pécuniaires et les sanctions pénales importantes (règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées, art 12 ; chapitre IV section I et II).

L'article 6 de ce même règlement stipule que toute station d'épuration doit respecter les normes suivantes :

- la demande biochimique en oxygène après 5 jours, partie carbonée (DBO<sub>5</sub>C), doit être inférieure ou égale à 25 mg/L;
- la concentration des matières en suspensions (MES) doit être inférieure ou égale à 25 mg/L, sauf s'il est démontré que le dépassement est causé par des algues proliférant dans des étangs d'épuration;
- la valeur du potentiel hydrogène (pH) doit se situer entre 6,0 et 9,5 (règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées, art 6, al. 1. par.3)

Le respect de ces concentrations est évalué périodiquement en fonction d'une moyenne d'effluent rejeté calculée pour les périodes mentionnées à l'annexe I et qui dépend de la taille de la station (règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées, art.6 al. 1, part .3).

Au Québec, La réglementation pour les rejets de phosphore total contenu dans les rejets d'eaux usées d'origine domestique est limitée varient entre 0,1 mg/L et 1,0 mg/L dépendamment du type de procédé de traitement (MDDELCC, 2016b)

En 2014, d'autres obligations ont été ajoutées dans la réglementation des ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées, qui doivent être respectés par les municipalités exploitant les stations d'épurations. En effet, il est désormais obligatoire pour les stations d'épuration de moyenne, grande ou de très grande taille, d'effectuer des tests de toxicité aiguë sur leurs effluents, pour les truites arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* ou la daphnie *Daphnia magna* ou les deux à la fois (Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées, art. 7).

### **1.2.3.2 Règlements fédérale**

Selon la réglementation fédérale, l'effluent doit satisfaire aux conditions suivantes :

- la demande biochimique en oxygène après 5 jours, partie carbonée (DBO<sub>5</sub>C), doit être inférieure ou égale à 25 mg/L;
- la concentration des matières en suspensions (MES) doit être inférieure ou égale à 25 mg/L, sauf s'il est démontré que le dépassement est causé par des algues proliférant dans des étangs d'épuration;
- la concentration moyenne de chlore résiduel total dans l'effluent ne doit pas dépasser 0,02 mg/L si du chlore ou l'un de ses composés a été utilisé lors du traitement des eaux usées;
- la concentration maximale d'ammoniac non ionisé dans l'effluent doit être inférieure à 1,25 mg /L exprimé sous forme d'azote (N) à 15 °C ± 1° C (Gazette du Canada, 2012).

#### **1.2.4 Mycorémédiation : une forme de biorémédiation**

La biorémédiation est par définition la dépollution des sites naturels (sol, eaux de surface ou souterraines) au moyen d'un ensemble de techniques faisant appel aux enzymes que les microorganismes, des champignons ou encore des végétaux produisent. Le nom donné au processus est variable et dépend du moyen utilisé pour décontaminer le sol, l'eau ou l'air. Par exemple, la bioremédiation effectuée au moyen de plantes vascularisées est appelée phytoremédiation, celle effectuée au moyen d'algues est appelée phycoremédiation et celle effectuée au moyen de champignons est appelée mycoremédiation. Le principe du procédé de la biorémédiation consiste à exploiter la capacité que possèdent certains organismes tels que les champignons, les microalgues ou encore les bactéries à dégrader les polluants en composés inertes comme l'eau et le gaz carbonique. Les moyens mis en œuvre lors du processus de la biorestauration semblent concorder avec le principe du respect de l'environnement et du développement durable.

### 1.2.5 Principaux mécanismes de la mycorémédiation

Plusieurs chercheurs ont employé divers champignons qu'ils soient sous leur forme active ou non afin d'éliminer les micropolluants (Singh, 2015). Trois principaux mécanismes ont pu être observés lors du processus d'élimination des micropolluants à savoir :

- la biosorption qui est un processus passif métaboliquement indépendant (ne requiert pas d'énergie) qui implique la fixation des solutés à la biomasse fongique
- la bioaccumulation qui est un processus métaboliquement dépendant d'énergie où les cellules se développant activement accumulent à l'intérieur de leur hyaloplasme les micropolluants
- la biodégradation qui est également un processus métaboliquement dépendant d'énergie où les molécules complexes sont décomposées en molécules plus simple à travers l'action de certaines enzymes. Le tableau 1.1 illustre les différences existant entre ces différents mécanismes.

Tableau 1.1 Comparaison entre les différents mécanismes :  
 biosorption, bioaccumulation, biodégradation  
 Adapté de Singh (2015)

<b>Biosorption</b>	<b>Bioaccumulation</b>	<b>Biodégradation</b>
Processus passif	Processus actif	Processus actif
Biomasse non vivante	Biomasse vivante	Biomasse vivante
Micropolluants sont fixés à la paroi cellulaire	Micropolluants sont fixés à l'intérieur de la cellule et à la paroi cellulaire	Micropolluants dégradés par les enzymes
Adsorption	Adsorption	Dégradation extracellulaire/ adsorption suivi de la dégradation
Mécanisme réversible	Mécanisme partiellement réversible	Mécanisme irréversible
Ne requiert pas de nutriments	Requiert des nutriments	Requiert des nutriments (milieu limitant en azote, conditions favorables)
Mécanisme à une étape	Mécanisme à deux étapes	Mécanisme à deux étapes
Taux d'élimination rapide	Taux d'élimination lent	Taux d'élimination lent
Métabolisme non contrôlé	Métabolisme contrôlé	Métabolisme contrôlé
Pas de danger ni d'effets toxiques	Danger des effets toxiques causés par les contaminants	Interférences par des contaminants, les sous-produits peuvent être toxiques
Pas de croissance cellulaire	Croissance cellulaire	Croissance cellulaire

En outre, chaque mécanisme a ses propres avantages et limites. Par conséquent, il est toujours plus avantageux d'utiliser un consortium microbien que des cultures pures au cours d'un procédé de traitement, car il met en jeu davantage de mécanismes de par leurs différentes interactions qui peuvent s'opérer au sein d'une culture que les cultures pures, ce qui le rend plus efficace.



### 1.2.5.1 Processus de mycoremédiation dans l'environnement

Dans la nature les différentes interactions entre composés organiques, inorganiques et champignons se déroulent comme suit. Les champignons transforment les composés organiques et inorganiques au moyen d'enzymes et métabolites de synthèses qui opèrent des modifications physicochimiques. Les composés organiques se trouvant dans l'environnement sont consommés par les champignons afin de produire des métabolites organiques, des exopolymères et de la biomasse. Les composés inorganiques consommés par les champignons produisent quant à eux des métabolites inorganiques, des minéraux secondaires et des métalloïdes. Les interactions entre les composés organiques et inorganiques entraînent des réactions de complexation et de chélation. La figure 1.1 résume le processus de la mycorémédiation observé dans la nature.

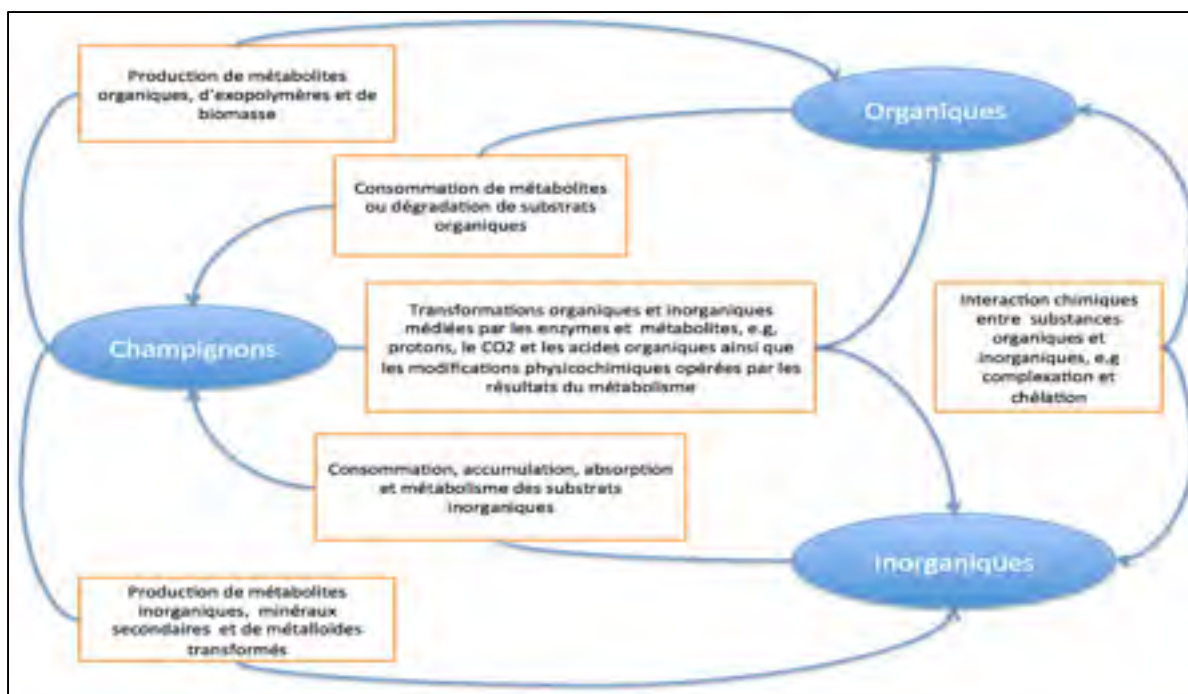


Figure 1.1 Modèle simplifié de l'action des champignons survenant naturellement et /ou de manière anthropogénique de dérivées organiques et inorganiques des substrats –

Adaptée de Singh (2015)

### **1.2.5.2 Concept de la mycorémédiation des eaux usées : technique des biofiltres**

Le concept de la mycoremédiation des eaux usées est une idée relativement récente et celui de la croissance des champignons sur des matériaux en vue d'un traitement des eaux usées l'est encore plus. Cette technique mis en place à la fin des années '90 avait déjà été testée par plusieurs auteurs (Alessandro et al., 1999; Rodríguez Couto et al., 2004; Shim et Kawamoto, 2002). À l'origine, le concept de la fixation des champignons sur des matériaux s'est inspiré de celui des biofiltres (lit bactérien) qui avait été développé sur des pierres qui servaient de média filtrant (Vargas, 2013). De nos jours, plusieurs types de matériaux et de formes différentes sont utilisés. Le principe de base des biofiltres consiste à fixer des micro-organismes à des supports afin de dégrader les polluants (Vargas, 2013).

#### **Mycoremédiation effectuée sur de l'eau usée non stérilisée**

Plusieurs recherches ont porté sur la mycoremédiation, en vue d'offrir un système décentralisé attrayant. Cependant, il y a eu peu de succès dans la traduction de ces résultats en des applications réelles. En effet, la mycoremédiation des eaux usées repose sur de nombreux facteurs à savoir : la croissance fongique, la composition du milieu de culture, l'âge de la culture fongique, la durée de l'activité enzymatique, etc. (Singh, 2015) et nécessite des bioréacteurs spécialement conçu à cet effet (Majeau, Brar et Tyagi, 2010). Par conséquent, il est important d'avoir un regard critique sur le mécanisme ou les voies de transformation des micropolluants lors de la conception d'une stratégie opérationnelle de la mycoremédiation. Plusieurs études récentes ont porté sur la description d'outils analytiques et statistiques afin d'atteindre ces objectifs. Par ailleurs, d'autres études mettent l'accent sur la conception de bioréacteurs adapté selon le mécanisme sous-jacent du champignon (Singh, 2015). Néanmoins, les études menés par (Pedroza; et al., 2006) sont prometteuses et démontre avec succès qu'il est possible de traiter l'eau usée non stérilisée au moyen de *T. versicolor* (un autre champignon de la pourriture blanche). En effet, ce champignon a montré la capacité de traiter les eaux usées provenant de l'industrie des pâtes et papiers dans des conditions non stériles. Après quatre jours de culture une réduction de 82 % de la DCO a été

observée ainsi que 80 % de dégradation de la couleur. La réduction de la DCO et de la couleur a corrélée positivement avec les activités laccase et manganèse peroxydase. Lors de cette étude, une élimination de 99 % du pentachlorophénol, du chlorophénol et du 2,3,4,6-tétrachlorophénol est également observée ainsi que 98 % de 3,4 dichlorophénol et de 77 % de 4-chlorophénol.

### 1.3 Mycoremédiation avec *Phanerochaete chrysosporium*

Les champignons sont des organismes eucaryotes et pourvus de membrane nucléaire. L'intérêt s'est porté sur un champignon en particulier *P. chrysosporium*. Il fait partie de la classe des champignons xylophages dits lignivores. Ces champignons ont la capacité d'hydrolyser les composants structuraux du bois et sont généralement divisés en trois grandes catégories : les champignons de la pourriture molle, ceux de la pourriture brune et ceux de la pourriture blanche, et cela, en fonction des résidus de leurs actions (Hodgson, 1998).

L'élimination des xénobiotiques phénoliques ou des polluants des eaux usées au moyen de *Phanerochaete chrysosporium* peut être effectuée de différentes manières :

- en utilisant l'enzyme libre purifiée. Cependant, (Majeau, Brar et Tyagi, 2010) rapportent que les eaux usées peuvent être traitées avec le fluide extracellulaire d'une culture fongique sans nécessité au préalable d'étape de purifications. La présence d'autres enzymes extracellulaires ainsi que celle de cellules entières pourrait améliorer le procédé d'assainissement des eaux usées (Majeau, Brar et Tyagi, 2010);
- en utilisant les enzymes immobilisées purifiées;
- à l'aide d'enzymes obtenues directement à partir de bouillon de culture fongique ;
- par la biorémédiation dans des bioréacteurs avec des cellules immobilisées ou libre.

Les études antérieures ont été effectués sur une diversité de polluants afin d'évaluer les capacités oxydantes des enzymes de *P. chrysosporium*. Cependant, des efforts limités ont été effectués sur eaux usées réels. Il a été rapporté par Singh et Tripathi (2007) que certains composés phénoliques pourraient inhiber la croissance des champignons de la pourriture

blanche. Néanmoins, les effets indésirables de ces composées pourraient être minimisés en effectuant des dilutions appropriées afin d'atteindre les stades de croissances recherchés.

### **1.3.1 Conditions de cultures adéquates pour la culture du champignon *P. chrysosporium***

Selon les études antérieures, les facteurs importants à suivre pour assurer une bonne croissance et une bonne activité métabolique fongique sont : la taille de l'inoculum, le pH, la température et la composition du milieu de culture (Rodriguez Couto et Sanroman, 2006).

#### **– Le pH**

Plusieurs auteurs tels que Galhaup et al (2002); Gao et al (2006) ont affirmé que lorsque le pH n'est pas contrôlé durant le processus de fermentation, une diminution du pH de la culture se produit lors de la phase de croissance ou lors de la phase de production enzymatique, et ceci serait associée à la libération d'enzymes ligninolytiques et d'autres facteurs acides excrétés. Les études menées par Glenn, Akileswaran et Gold (1986) ont plutôt montré que le pH qui assure une production enzymatique maximale de *P.chrysosporium* se situe entre 4,5 et 5,5. De plus, (Chandrashekar, Felse et Panda, 1999); Yang et Liao (1998) ont montrés que le pH a un effet significatif sur la physiologie, la croissance, la multiplication et la viabilité des microorganismes.

#### **– La température**

Concernant la température, Vassilev et al. (2009) affirment que la température optimale pour la croissance et pour une bonne production enzymatique de *P.chrysosporium* se situe entre 30 et 35°C et Majeau, Brar et Tyagi (2010) rapportent que la production d'enzymes ligninases est stable dans des conditions douces à température ambiante entre 25 et 30°C. Cependant, Vassilev et al. (2009) rapportent qu'à 39 °C, la production de l'enzyme MnP diminue et rapportent également que la production des enzymes ligninases est moins stable à cette température.

## – Composition du milieu de culture

Concernant la quantité de nutriment à apporter dans le milieu de culture, l'étude menée par Bonname, Perez et Jeffries (1991) a montré que certains champignons de la pourriture blanche poussent mieux dans des conditions limitantes en carbone et en azote tandis que d'autres performant mieux sous des conditions suffisamment carbonées et azotées. Shim et Kawamoto (2002) affirment pour leur part qu'en milieu limitant en azote la production des enzymes peroxydases est plus importante qu'un milieu à haute teneur en azote chez *P.chryso sporium* et ils ont également constaté une plus forte pousse de la biomasse fongique pour le milieu à forte teneur en azote que pour le milieu limitant en azote. Cependant, Xiong et al. (2008) rapportent que les cultures fongiques effectuées dans des milieux contenant un excès de glucose et d'azote produisent de grandes quantités de polysaccharides. L'étude effectuée par Kaushik et Malik (2010) a quant à elle démontré et confirmé le changement de structure du champignon *Aspergillus lentulus* (un autre champignon microscopique) par des prises de photo microscopiques (x10) effectuées à 0,1 %, 0,2 %, 0,5 % et 1 % de glucose lors d'une étude portant sur le traitement des colorants issues des effluents industriels.

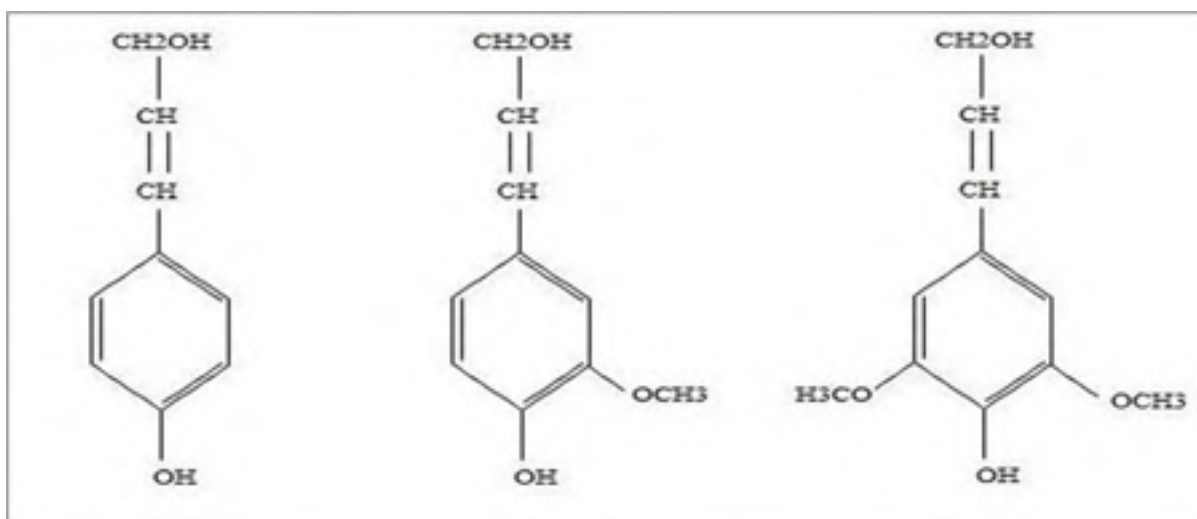
### 1.4 Description et localisation du champignon *P. chryso sporium*

*P.chryso sporium* se retrouve dans les forêts tempérées de l'Amérique du nord, des zones Européennes et également en Iran (Burdsall, 1985). Il est décrit comme étant un champignon microscopique, filamenteux et causant la pourriture blanche du bois. Au niveau microscopique, ce champignon colonise les lumens du bois au moyen de ses hyphes, pénètre à travers les cavités formées dans le bois et passe de cellules en cellules (Barclay, 1991). Il est capable de dégrader la lignine, qui est un composé difficilement biodégradable par le biais de la sécrétion d'enzymes extracellulaires qui lui permettent d'accéder à sa principale source de carbone : la cellulose (Lewandowski, Armenante et P.A.K, 1990). L'intérêt qui est porté à *P. chryso sporium* dans le domaine de la biodégradation des polluants récalcitrants est principalement dû à la faible spécificité de ses enzymes extracellulaires (Fernando, Aust et

Bumpus, 1990) et aussi par les avantages que présente sa culture. En effet, ses capacités de dégradation ainsi que sa croissance rapide lui confèrent la place de champignon modèle de la pourriture blanche du bois. Sa température optimale de croissance est d'environ de 40°C mais il est capable de croître à des températures plus élevées (Driss, 2012). Ce champignon est très étudié présentement, ce qui a donné lieu au séquençage complet de son génome en 2004 (Driss, 2012). Il produit trois types d'enzymes : la laccase (Lac), les lignines peroxydases (LiP) et les manganèses peroxydases (MnP). Les deux dernières ont été plus particulièrement étudiées par la littérature.

#### **1.4.1 Structure et mécanisme de biodégradation de la lignine**

La lignine est un polymère complexe ayant une structure tridimensionnelle. C'est le deuxième polymère naturel le plus répandu sur la planète après la cellulose (Driss, 2012). La complexité de sa structure est due à la présence de différents types de liaisons dans sa configuration ce qui confère au bois son hydrophobicité. Elle rend les végétaux (en particulier les arbres) rigides. La lignine est constituée principalement de phénylalanine à partir de laquelle dérivent les trois autres constituants majoritaires (monolignols) qui sont les suivants : l'alcool coumarylique, l'alcool coniféryliques et l'alcool sinapylique. Les trois constituants majoritaires, une fois intégrés dans la lignine sont également nommés respectivement unités H,G,S (Driss, 2012) (figure 1.2). La pectine, le rhamnose ou encore l'HRGP (l'hydroxylproline riche glyco protéine) peuvent également entrer dans la constitution des parois (Driss, 2012). La structure de la lignine peut s'avérer être hétérogène à cause de sa biosynthèse stéréospécifique ainsi que de la variabilité de la quantité et du type des alcools précurseurs (Bumpus et Aust, 1987). Ce manque d'homogénéité structurale couplé à la nature du polymère confère à la lignine cette résistance connue à la plupart des systèmes enzymatiques (Bumpus et Aust, 1987). *P. chrysosporium* dégrade la lignine via la libération d'enzymes extracellulaires qui permet de rompre les liaisons de la structure tridimensionnelle afin de les transformer en composant plus facilement assimilable par son métabolisme.



Alcool p-coumarylique

Alcool coniférylique

Alcool sinapylique

Figure 1.2 Composés phénoliques précurseurs de la lignine  
Tirée de Driss (2012)

Les enzymes extracellulaires sont des agents oxydants non spécifiques (peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyl) utilisés pour cliver la lignine (Burdshall et Eslyn, 1974). Le mécanisme intracellulaire de *P. chrysosporium* bien que peu connu permet la minéralisation des fragments produits lors de la dépolymérisation. Les sections suivantes décrivent plus en profondeur les mécanismes de dégradation de la lignine au moyen des enzymes de *Phanérochaete chrysosporium*.

#### 1.4.2 Mécanisme d'action des enzymes peroxydases

Les peroxydases sont des enzymes oxydases ayant comme accepteur final d'électrons des peroxydes (ROOH) leur permettant de catalyser une multitude de réactions d'oxydation selon leurs substrats (Driss, 2012). Les peroxydases sont classées en deux grandes catégories, celles possédant un noyau hémique et celles n'en possédant pas. Les réactions qu'elles catalysent sont du type :



Où :

Ared : substrat réduit

Aox : substrat oxydé

#### 1.4.2.1 Lignine-peroxydases

Les lignines-peroxydases (LiP) encore appelées dirarylpropane peroxydes sont des glycoprotéines possédant un noyau protophyrine. Elles permettent la rupture des liens C-C et C-O (Bumpus et Aust, 1987) ainsi que l'oxydation des anneaux aromatiques (Kersten et al., 1985), ce qui entraîne la dépolymérisation de la lignine. Ces réactions de dépolymérisations sont suivies de plusieurs autres réactions telles que la décarboxylation (Akamatsu et al., 1990), l'ouverture des noyaux aromatiques, les processus de déméthoxylation, la formation de radicaux libres hydroxyles (Forney et al., 1982) et des réactions de couplages phénoliques (Schoemaker et Leisola, 1990).

L'activité catalytique des LiP est dépendante du  $\text{H}_2\text{O}_2$  car elle permet de les oxyder (figure 1.3). Les LiP impliquent également l'intervention de certaines molécules afin de dégrader la lignine. Ces molécules sont les suivantes : le fer ferrique et ferreux, l'oxalate, les radicaux hydroxyl et l'alcool vératrylique (VA) (Barr et al., 1992). La synthèse du VA chez *P. chrysosporium* s'effectue en même temps que la production de LiP, au moment de la synthèse des métabolites secondaire (Fenn et Kirk, 1981). Le rôle du VA n'est pas encore défini avec certitude. Cependant, Driss (2012) suggère que l'alcool vératrylique réagirait avec les LiP pour former un cation radicalaire, un oxydant actif agissant directement sur les substrats. Le VA jouerait également un rôle de protection contre les inactivations des LiP que pourrait causer le  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le cation radicalaire servirait de médiateur redox. En effet, Faison et Kirk (1985); Leisola, Ulmer et Waldner (1984) ont constaté que l'ajout de VA dans une culture de *P. chrysosporium* augmenterait le taux initial de minéralisation de la lignine. Ce



radical a pu être mis en évidence par résonnance électronique de spin (Driss, 2012). Chez *P. chrysosporium*, dix isoformes de LiP ont pu être mis en évidence par Kersten et Cullen (2007). Chez les champignons de la pourriture blanche. Ce nombre élevé d'isoformes semble être constant. Ainsi, seize isoformes de la LiP ont pu être détectés chez *T. versicolor* (Driss, 2012).

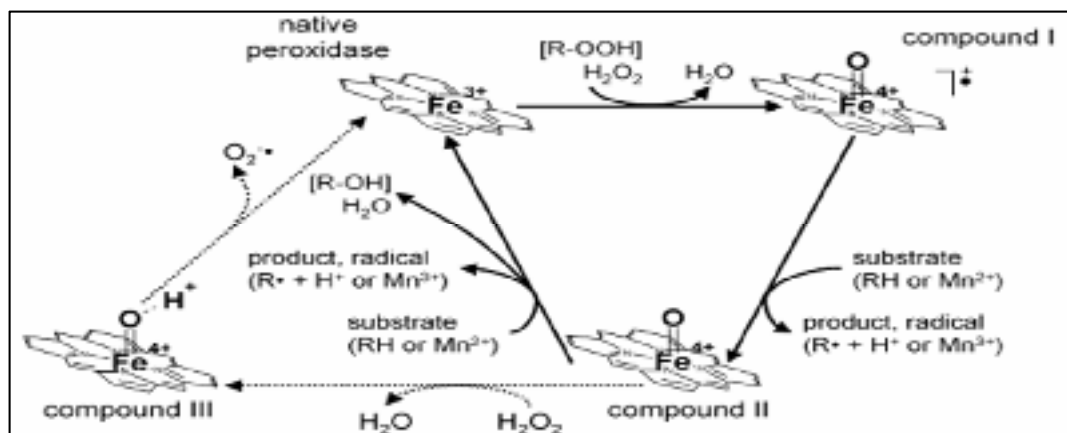


Figure 1.3 Mécanisme catalytique de la LiP  
Tirée de Kersten et Cullen (2004)

La Figure 1.3 représente le mécanisme catalytique de la LiP. Celle-ci est d'abord oxydée (via deux électrons successifs) par le  $H_2O_2$  sécrété par le champignon afin de former le radical cationique (composé I). Ce radical est ensuite réduit en un électron pour induire la formation du composé II de la LiP. Cette réduction s'effectue suivant l'oxydation d'un substrat : l'alcool vératrylique. Le VA permet à l'enzyme transformé (composé II) de se reconvertir en enzyme natif et de former le radical cationique  $VA^{++}$ . Cependant, l'enzyme, en présence  $H_2O_2$  et privée de VA, se transforme de façon irréversible en composé III et perd de son activité. L'activité catalytique de l'enzyme diminue après un certain nombre de réductions.

#### 1.4.2.2 Manganèse-peroxydases

Les manganèses peroxydases (MnP) sont des enzymes produites par plusieurs champignons de la pourriture blanche, dont *P. Chrysosporium* (Kuwahara et al., 1984; Paszczynski, Huynh

et Crawford, 1987). Elles ont besoin de manganèse comme médiateur (Kersten et Cullen, 2007) et oxydent le  $Mn^{2+}$  en  $Mn^{3+}$  au moyen du  $H_2O_2$  (Paszczyński, Huynh et Crawford, 1985). Le cycle catalytique des MnP fonctionne suivant trois formes distinctes de l'enzyme. Au départ, l'enzyme est sous forme native et est oxydée par le  $H_2O_2$  en MnP-I et qui à son tour est réduite par le  $Mn^{2+}$  pour ainsi former le composé II. À partir de ce composé II, l'enzyme peut retrouver son état natif grâce à une seconde oxydation du  $Mn^{2+}$  (Wariishi et al., 1989). Le manganèse sous forme  $Mn^{3+}$  libérée lors de cette réaction qui enclenche à son tour la dégradation de la lignine pour ainsi passer à sa forme  $Mn^{2+}$ . L'activité des MnP peut être stimulée si les ions  $Mn^{3+}$  sont stabilisés par des acides organiques tels que l'acide oxalique qui leur permet de former des composés capables de diffuser plus facilement (Glenn, Akileswaran et Gold, 1986).

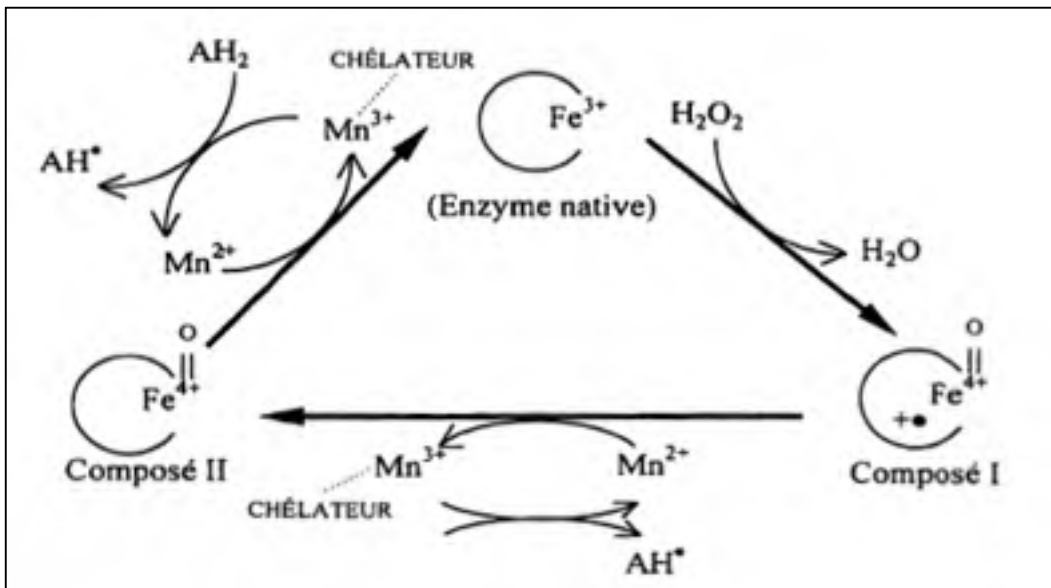


Figure 1.4 Mécanisme catalytique de la MnP (Hodgson, 1998)

Dans le processus de dégradation de la lignine, les MnP sont impliqués dans l'oxydation des composés phénoliques et non phénoliques. Par conséquent, la synergie qui peut exister entre LiP et MnP assure une meilleure oxydation d'une plus grande variété de molécules récalcitrantes. Les aldéhydes et acides aromatiques représentent principalement les sous-produits de cette dégradation qui sont à leur tour clivés et minéralisés ou sont transformés en

quinones et hydroquinones qui sont également vouées à être minéralisées (Schoemaker et Leisola, 1990).

### **1.4.2.3 Laccases**

Les laccases sont, quant à elles, des métalloprotéines contenant dans leur structure quatre atomes de cuivre (Cu) (Thurston, 1994) et ayant comme accepteur final le dioxygène (O<sub>2</sub>). Elles sont capables d'oxyder autant des composés phénoliques que certains composés inorganiques ainsi que des diamines inorganiques (Driss, 2012). Leur production est régulée par la présence de Cuivre (collins et Dobson, 1987; Palmieri et al, 2000). Certains xénobiotiques peuvent également les moduler (Gonsales et al, 2002; Xioa et al, 2004).



## CHAPITRE 2

### MÉTHODOLOGIE

Ce présent chapitre décrit les différentes méthodes utilisées pour activer les champignons sur milieu solide et liquide, pour calibrer les matériaux, quantifier la biomasse fongique fixée sur les supports ainsi que les procédures adoptées pour optimiser l'efficacité du traitement fongique et celles utilisées pour quantifier la production enzymatique.

#### 2.1 Activation du champignon sur milieu solide

Le champignon *Phanerochaete chrysosporium* VKMF-1767 (ATCC 20696) de la compagnie Cedarlane a été utilisé pour tous les essais fongiques. La souche a été maintenue dans des boîtes de pétrie dont la composition du milieu est celle utilisée par Ming et Kent (1988). Les boîtes ont été entreposées à 4°C après 4 jours de culture à 30°C, temps nécessaire pour couvrir le milieu solide d'une quantité suffisante de mycélium (figure 2.1). Le tableau 2.1 décrit la composition du milieu solide.



Figure 2.1 Culture en milieu solide de *P. chrysosporium*

Tableau 2.1 Composition du milieu de culture fongique solide

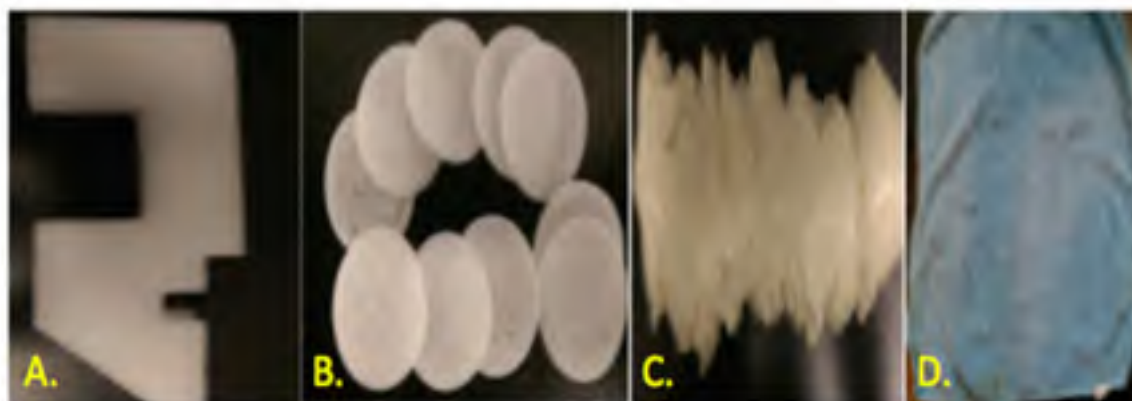
<b>Produits</b>	<b>Concentration des produits dans le milieu en (g/L)</b>
Agar	20
Glucose	10
Extrait de malt	10
Peptone	2
Extrait de levure	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2
Asparagine	1
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	1
Thiamin-HCl	10 <sup>-3</sup>

## 2.2 Essais de greffage fongiques sur biomatériaux

La structure chimique, la texture, la porosité ainsi que la forme des supports utilisés pour cette étude n'ont pas été étudiée pour ce présent essai. Les matériaux sélectionnés pour cette étude sont les suivants : la mousse de polyuréthane (dilatation triple ; 2 Po d'épaisseur) de marque et de provenance RONA, le polyéthylène issus des matériaux d'emballage d'appareil, les morceaux de chiffons en microfibres provenant du commerce, et les pastilles poreuses provenant d'un industriel (Dégremont). Les caractéristiques et spécificités des différents matériaux utilisés figurent au tableau 2.2.

### 2.2.1 Calibrage des matériaux

L'étape du calibrage est une étape importante à mener puisque cette dernière permet de comparer les différents matériaux entre eux en termes de pousse mycélienne. La forme initiale des matériaux a été retravaillée afin de leur donner une forme plus spécifique tout en essayant de garder le même poids apparent, hormis les pastilles qui étaient déjà toutes calibrées et sous forme de disque (figures 2.2 et 2.3)



**A.** Polyéthylène, **B.** Pastilles de Dégrémont, **C.** Mousse de polyuréthane, **D.** Chiffon en microfibres

Figure 2.2 Forme initiale des matériaux

Après avoir taillé les matériaux, chacun d'eux est pesé de manière à ce que les différents supports aient un poids de  $0,185 \pm 0,015\text{g}$ . Ensuite, 10 échantillons de chacun de ces matériaux calibrés sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse cette mesure permet de calculer le volume ainsi que la surface spécifique moyenne.



Figure 2.3 Forme retravaillée des matériaux

Le tableau 2.2 regroupe les spécificités des matériaux. Le prétraitement des matériaux synthétiques a été effectué selon la méthode décrite par Rodríguez Couto et al. (2004), tandis que les morceaux de chiffon en microfibre ont été bouillis dans de l'eau distillée contenu dans un bécher pendant environ 20 min.

Tableau 2.2 Spécificité des supports utilisés pour former les greffons de *P. chrysosporium*

Matériaux	Surface moyenne (cm <sup>2</sup> )	Volume Moyen (cm <sup>3</sup> )	Gravité spécifique (g/cm <sup>3</sup> )	Surface spécifique (cm <sup>2</sup> /cm <sup>3</sup> )	Forme des matériaux
Pastille	2,83	0,29	0,69	9,79	Disque
Polyuréthane	4,06	2,09	0,09	1,94	Ellipsoïdale
Polyéthylène	2,6	3,38	0,05	0,77	Parallélépipède
Textile	7,45	0,75	0,25	9,93	Rectangle

### 2.2.2 Préparation du milieu de culture liquide fongique

Le passage de la culture en milieu solide à la culture en milieu liquide a été élaboré en raclant la couche superficielle mycélienne formée dans les boîtes de pétrie (figure 2.1) à l'aide d'une anse en plastique stérile, puis introduit dans de l'eau distillée stérile (cette opération s'est effectuée sous bec bunsen dans des conditions stériles) jusqu'à l'obtention d'une densité optique des spores de 0,5 à une longueur d'onde de 650 nm. La longueur d'onde a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre DR2700 HACH. La méthode utilisée pour la préparation du milieu liquide est celle utilisée par Ming et Kent (1988). Le milieu de culture utilisé pour les essais de greffage de *P. chrysosporium* avait le glucose comme principale source de carbone. Le Tableau 2.3 décrit la composition du milieu de culture fongique, le volume utilisé ainsi que la méthode de stérilisation utilisée pour chacun des produits. Cependant, la composition complète du milieu Basal III et celle des éléments en trace sont répertoriées à l'annexe 1.



Tableau 2.2 Composition du milieu de culture fongique liquide

Produits	Concentration de la solution mère		Volume utilisé (mL)	Stérilisation
	(g/L)	M		
Basal III	-	-	100	Filtre 0,45 µm
Glucose	100	-	100	Autoclave
Tartrate d'ammonium	8	-	25	Autoclave
Thiamin HCl	0,1	-	10	Filtre 0,45 µm
Vératryl alcool	-	0,004	100	Autoclave
Eléments en traces	-	-	60	Filtre 0,45 µm
2,2 diméthyl succinate (pH 4,2)	-	0,1	100	Autoclave
Spore	-	-	100	-

### 2.2.3 Procédure d'immobilisation

Chacun des matériaux prétraités sont introduit dans quatre erlenmeyers distincts de 250 mL comportant chacun une portion aliquote du milieu de culture liquide précédemment décrit (100 mL) et mis à incuber à 30°C sous bullage d'air à l'obscurité et pendant cinq jours.

#### **2.2.4 Estimation de la biomasse fongique**

Afin de quantifier et de vérifier que *P. chrysosporium* a bien adhéré sur les supports, la croissance de la biomasse a été déterminée en mesurant le poids sec du mycélium sur chaque support après cinq jours de culture. Les différents erlenmeyers sont agités à 50 rpm pendant 5 minutes. Ensuite, les coupelles à languette en aluminium vides sont pesées, puis les greffons y sont placés à l'aide d'une pince et mis à sécher à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids stable (cette expérience a été faite en triplicata pour chaque type de matériaux). Les greffons sont ensuite placés pendant 5 à 10 min dans un dessiccateur avant leur pesée finale.

### **2.3 Description du site d'étude**

L'échantillon d'eau usée utilisé pour les différents tests était d'origine domestique et provenait de la Régie d'assainissement des eaux du bassin de La Prairie (RAEBL), qui a la responsabilité de traiter les eaux usées de cinq villes situées dans la partie ouest de la couronne sud de Montréal : Candiac, Delson, La Prairie, Sainte-Catherine et Saint-Constant. La station est dotée d'un procédé de traitement par boues activées de type aération prolongée. Elle traite jusqu'à 65 millions de litres d'eaux usées par jour. Les eaux des cinq municipalités sont acheminées à l'usine de traitement via un intercepteur d'une longueur de 6 km. À l'extrémité de cet intercepteur, une station de pompage remonte ces eaux brutes à la station de traitement.



Figure 2.4 Localisation de station d'épuration de la Prairie

Une fois arrivée dans l'usine de traitement l'eau brute passe par plusieurs étapes de traitements dont : un prétraitement, un traitement biologique, et un traitement des boues.

Les échantillons d'eau usée utilisés lors de cette étude ont été prélevés après l'étape de prétraitement. Les caractéristiques moyennes de l'eau usée prélevée durant la période expérimentale sont répertoriées au tableau 2.4.

Tableau 2.3 Caractéristiques moyennes des eaux usées brute de La Prairie

Paramètres	Concentration moyenne
DCO mg-O <sub>2</sub> /L	400 +/- 20
DBO <sub>5</sub> mg-O <sub>2</sub> /L	180 +/- 10
MES mg/L	250 +/- 20
Pt mg P-PO <sub>4</sub> /L	6 +/- 2
Nitrate NO <sub>3</sub> - mg/L	22 +/- 2
Alcalinité mg CaCO <sub>3</sub> /L	255 +/- 5
Couleur vraie PtCo	60 +/- 2
Azote ammoniacal mg-N/L	25 +/- 1
pH	7 +/- 0,2

## 2.4 Procédure expérimentale de l'optimisation du traitement

L'échantillon d'eau a été entreposée à 4°C dans un bidon de 20 L et renouvelée toutes les 3 à 4 semaines. L'optimisation des paramètres de culture a été effectuée en faisant varier un paramètre sur la base des meilleurs résultats expérimentaux ayant été obtenus.

### 2.4.1 Effets du support sur le traitement fongique

La figure 2.5 présente le protocole expérimental général adopté pour évaluer les effets du support sur le traitement fongique ainsi que celui utilisé pour le criblage des paramètres. Un volume de 450 ml d'eau usée a été introduit dans respectivement deux erlenmeyers dont chacun contenait également 50 mL de solution de basal III additionné de 1% de glucose ainsi que de 0,2 g de copeaux de bois, de 1 mM d'alcool vératrylique et d'environ 10 gouttes de tween 80 à 0,05%. L'un des erlenmeyers contenait 75 greffons et l'autre 3 mL de mycélium en solution. Après inoculation, les deux erlenmeyers sont immédiatement soumis à un

bullage d'air au moyen d'une pompe à air MARINA 300 et mis à incuber pendant 6 jours au pH du milieu et à température ambiante.

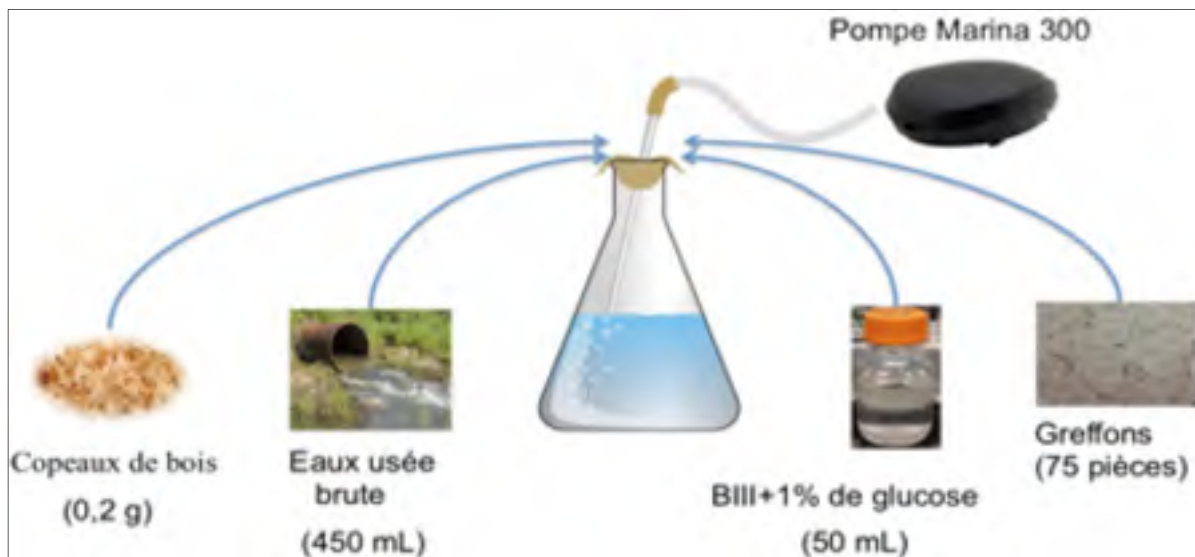


Figure 2.5 Procédure expérimentale générale pour le traitement fongique

#### 2.4.2 Effet de la quantité de greffons sur le traitement fongique

La méthode utilisée afin d'évaluer les effets de la quantité de greffons sur le traitement de l'eau usée est issue principalement d'une adaptation d'un couplage de deux méthodes dont celle décrite par Asgher, Jamil et Iqbal (2012) et de Shim et Kawamoto (2002). Le protocole se présente comme suit : 450 mL d'eau usée brute ont été introduit dans respectivement quatre erlenmeyers ainsi que 0,2 g de copeaux de bois et 50 mL de Basal III de Kirk additionné de 1% de glucose (volume final 500 mL). Cette composition de base du milieu à traiter a été maintenue pour toutes les expériences fongiques. Chaque erlenmeyer contenait respectivement 25, 50, 75, et 100 greffons. Après avoir introduit les greffons, tous les erlenmeyers ont immédiatement été soumis à un bullage d'air au moyen d'une pompe à air MARINA 300 et ont également été incubés à température ambiante  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , et au pH du milieu liquide (6,9). L'expérience a duré 6 jours comme toutes les autres expériences effectuées dans la section d'optimisation. Un autre test complémentaire a été mené afin de

comparer le traitement effectué au moyen de 25 greffons après 6 jours et après 10 jours de culture.

#### **2.4.3 Effet du pH sur le traitement fongique**

Tous les erlenmeyer ont été inoculés avec 75 greffons (optimum) et laissés à température ambiante. Le pH a été ajusté respectivement à pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 et 5,0 avec du NaOH/HCl et mesuré à l'aide d'un pH-mètre (OAKTON) avant incubation. Cependant, après 6 jours de traitement, une diminution de pH est constatée suite probablement à l'activité des microorganismes et champignons contenu dans l'eau usée et un test complémentaire a été effectué à pH 5,0 et à 6,9 (pH du milieu liquide) avec cette fois un réajustement du pH toutes les 24 h durant 6 jours.

#### **2.4.4 Effet de la température d'incubation sur le traitement fongique**

La température jouant un grand rôle sur l'efficacité du traitement fongique et la production enzymatique. Le nombre de greffons présélectionnés pour cette étude (75 greffons) a été placée dans le milieu de culture à pH 6,9 puis soumis à différentes températures dont celles à 20°C, 22,5°C, 25°C, 30°C, 35°C et 39°C.

#### **2.4.5 Effet de la concentration en glucose**

Pour évaluer l'effet de la concentration en glucose sur le traitement fongique, les greffons sont soumis à différentes concentrations de glucose dont 1,5 %, 2 %, 2,5 %, et 3 % contenues respectivement dans la solution de basal III qui compose le milieu de culture à température ambiante et au pH du milieu liquide.

## **2.5 Effet de la source d'azote et de la concentration en azote**

La source et la concentration en azote étant étroitement liée à la production d'enzymes lignolytiques. L'apport de ce dernier dans le milieu de culture peut jouer un rôle important lors du traitement fongique.

### **2.5.1 Effet de la source d'azote**

Une concentration de 0,2 % de différentes sources d'azote a été utilisée tels que le tartrate d'ammonium, le peptone et l'extrait de levure qui ont été respectivement ajoutés dans la solution de basal III contenant 1 % de glucose dans trois erlenmeyers distincts ainsi que 75 greffons, 0,2 g de copeaux de bois, et 450 mL d'eau usée à température ambiante et au pH du milieu liquide.

### **2.5.2 Effet de la concentration en azote**

Le tartrate d'ammonium à 1,1 mM (faible concentration en azote) et à 11 mM (forte concentration en azote) ont été testés afin d'en évaluer l'effet sur le traitement fongique. Le tartrate d'ammonium à faible concentration et le tartrate d'ammonium à forte concentration ont été introduits dans respectivement deux erlenmeyers comportant le milieu de culture de base et 75 greffons. Le temps d'incubation était également de 6 jours à température ambiante et au pH du milieu liquide.

## **2.6 Effet des médiateurs**

Trois médiateurs ont été sélectionnés pour cette étude dont le vératryl alcool (VA), le manganèse sulfate monohydraté ( $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$ ) ainsi que le Tween 80. Les deux premiers (VA et  $\text{MnSO}_4$ ) induiraient respectivement la production de la LiP et de la MnP tandis que le Tween 80 protégerait l'enzyme secrété LiP. Pour se faire, 5 mL d'une solution 1 mM de VA et de  $\text{MnSO}_4$  ont été ajoutés à la solution ainsi que quelques gouttes de tween 80 à 0,05 % (10

gouttes) dans chaque dispositifs. . Les conditions de cultures étaient de 6 jours à température ambiante et au pH du milieu liquide

## **2.7 Étude de la production enzymatique**

L'activité enzymatique de la lignine peroxydase (LIP) a été mesurée d'après la méthode de Tien et Kirk (1984). La méthode consiste à mesurer le taux initial de la production de véatraldéhyde à partir de l'alcool véatrylique (Sigma-Aldrich). L'activité de la solution est exprimée en unité d'activité par litre (U/L). Par définition, une unité d'activité LIP transforme 1  $\mu$ mole d'alcool véatrylique en véatraldéhyde par minute. Le protocole complet de dosage de la LIP est inclus à l'annexe 2. L'activité enzymatique de la manganèse peroxydase MnP a été déterminée selon la méthode de Paszczyński, Huynh et Crawford (1987). Par définition une unité d'activité MnP transforme 1  $\mu$ mole vanillylacétone en véatraldéhyde par minute. Le protocole complet est aussi inclus à l'annexe 3. Les dosages d'activité enzymatique ont été effectués à 30°C sur le surnageant de l'eau usée traitée au sein d'une cuvette en quartz à l'aide du spectrophotomètre CARY 300 UV/VIS (VARIAN).

## **2.8 Évaluation du traitement fongique**

Pour évaluer l'efficacité du traitement fongique cinq principaux tests ont été effectués tels que : la demande chimique en oxygène (DCO), la demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>), la matière en suspension (MES/MVES), le dosage de l'azote ammoniacal ainsi que le test phosphore total. Les tests du nitrate, du pH, d'alcalinité et de couleur ont également été effectués.

### **2.8.1 Détermination du pourcentage de décoloration de l'eau**

Pour déterminer le pourcentage de décoloration de l'eau, l'échantillon à analyser est d'abord filtré à l'aide d'un filtre de verre Ahtrom de 1.2-1,5  $\mu$ m afin de retirer les matières en suspension (MES). Le filtrat ainsi obtenu est placé dans une cuvette en quartz de 10 mL puis



mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre DR2700 à 455 nm de longueur d'onde. Le résultat est exprimé en PtCo. Cette opération est effectuée avant et après les 6 jours de traitement.

Le pourcentage de décoloration est calculé comme suit :

$$\% \text{ Décoloration} = 100 * (\text{Absini} - \text{Absfin}) / \text{Absint} \quad [2]$$

où Absini : absorbance initiale

Absfin : absorbance finale

### **2.8.2 Méthodes analytiques**

Le tableau 2.6 répertorie les méthodes d'analyses utilisées ainsi que le matériel nécessaire pour chacune de ces méthodes.

Tableau 2.4 Matériel et méthodes utilisées pour effectuer les tests en laboratoire

Paramètres	Méthode d'analyse	Matériel
DCO soluble	SMEWW* Méthode 5220B	Tubes de digestion de 50 mL en pyrex Filtre de verre Ahlstrom 1,2 µm Plaque chauffante LABTECH LMS1003
DBO <sub>5</sub> soluble	SMEWW Méthode 5210B	Incubateur (réfrigérateur transformé) Capsules Polyseed Inhibiteur de nitrification HACH Filtre de verre Ahlstrom 1,2 µm-1,5 µm
MES/MVES	SMEWW Méthode 2540D et E	Filtre de verre Ahlstrom 1,2 µm Four 105°C: VWR-1305U Four 550°C: LABTECH -Z-SCIENCE
Azote Ammoniacal	SMEWW Méthode 4500 NH <sub>3</sub> C	Distillateur Selecta pro-Nitro S-Z Science
Phosphore total	SMEWW Méthode 4500-P E	Tubes de digestion de 50 mL en pyrex Plaque chauffante LABTECH LMS1003 Spectrophotomètre Cary 300
pH	SMEWW Méthode 4500-H <sup>+</sup> pH Value	pH-mètre portatif
Alcalinité	SMEWW Méthode 2320B	-
Nitrate NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HACH WAH Méthode 8039 (HR)	Spectrophotomètre HACH DR2700 NitraVer5 HACH
* Standards methods for the examination of water and wastewater (SMEWW)		

## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

Ce chapitre est divisé en trois sections. La première section porte sur l'identification d'un potentiel support pour la fixation de *Phanerochaete chrysosporium*. La seconde section évalue les effets du support sur le traitement fongique ainsi que sur la production enzymatique. La dernière section porte sur l'évaluation de l'efficacité du traitement par les greffons de *Phanerochaete chrysosporium* en fonction des paramètres susceptibles d'améliorer son efficacité et cela au moyen de différentes batteries de tests.

#### 3.1 Biomasse fongique

La première partie de ce projet de recherche consistait à vérifier l'adhérence du champignon *P. chrysosporium* à différents supports. La combinaison du champignon et du support permet ainsi de former des greffons. La figure 3.1 illustre la croissance fongique observée après cinq jours de culture en fonction du poids des matériaux de la surface et du volume (g/g de matériaux, g/cm<sup>2</sup> et par g/cm<sup>3</sup>). La souche a bien adhéré à tous les supports et elle a tapissé de minces couches de mycélium à leurs surfaces voir figure ci-dessous.



A: chiffons en microfibres ; B: polyéthylène ; C: polyuréthane ; D: Pastilles de Dégremont

Figure 3.1 Greffons de *Phanerochaete chrysosporium*

La plus forte croissance a été observée pour le polyuréthane avec une masse fongique allant jusqu'à 4,5 g/g de matériaux. Le polyéthylène présentait également des niveaux de croissance élevés estimés à 2,9 g/g de matériaux. Les niveaux de croissance sur les pastilles et les morceaux de chiffons en microfibre étaient assez semblables dont 0,7 g/g de matériaux pour les morceaux de chiffons en microfibre et 0,5 g/g de matériaux pour les pastilles de Dégrémont.

Les résultats observés lors de la mesure de croissance fongique en fonction de la surface ( $\text{g}/\text{cm}^2$  de matériaux), montrent que la mousse de polyuréthane avait une masse allant jusqu'à  $0,2 \text{ g}/\text{cm}^2$  de matériaux. Cette croissance est similaire à celle répertoriée pour le polyéthylène. La croissance observée sur les pastilles de Dégrémont est plus de deux fois plus élevée que celle observée pour des morceaux de chiffons en microfibre avec respectivement  $0,038 \text{ g}/\text{cm}^2$  pour les pastilles contre  $0,017 \text{ g}/\text{cm}^2$  pour les morceaux de chiffons en microfibre.

Par ailleurs, si ces résultats sont examinés sous l'angle du volume c'est à dire en terme de  $\text{g}/\text{cm}^3$  les pastilles de Dégrémont pourraient s'avérer une option intéressante à explorer car elles avaient des niveaux de croissance assez semblables à celles répertoriées pour la mousse de polyuréthane avec des valeurs allant jusqu'à  $0,37 \text{ g}/\text{cm}^3$  pour les pastilles contre  $0,4 \text{ g}/\text{cm}^3$  pour la mousse de polyuréthane. La croissance fongique répertoriée pour les morceaux en microfibre était similaire à celle du polyéthylène.

En somme, les résultats de l'immobilisation indiquent que la mousse de polyuréthane a produit la plus forte croissance de la biomasse suivie du polyéthylène. Cependant, ces matières sont trop légères et la force du brassage effectuée par le bullage d'air ne leur permettra pas vraiment d'optimiser le contact entre l'eau usée et les champignons. La mousse de polyuréthane et le polyéthylène occupent également un grand volume dans les erlenmeyers. Malgré la croissance observée sur toute la surface des morceaux de chiffons en microfibre, cette dernière absorbe beaucoup d'eau et se retrouve au fond des erlenmeyers.

Cette caractéristique n'étant pas recherchée, le choix s'est alors dirigé sur les pastilles de Dégremont pour la suite des expériences.

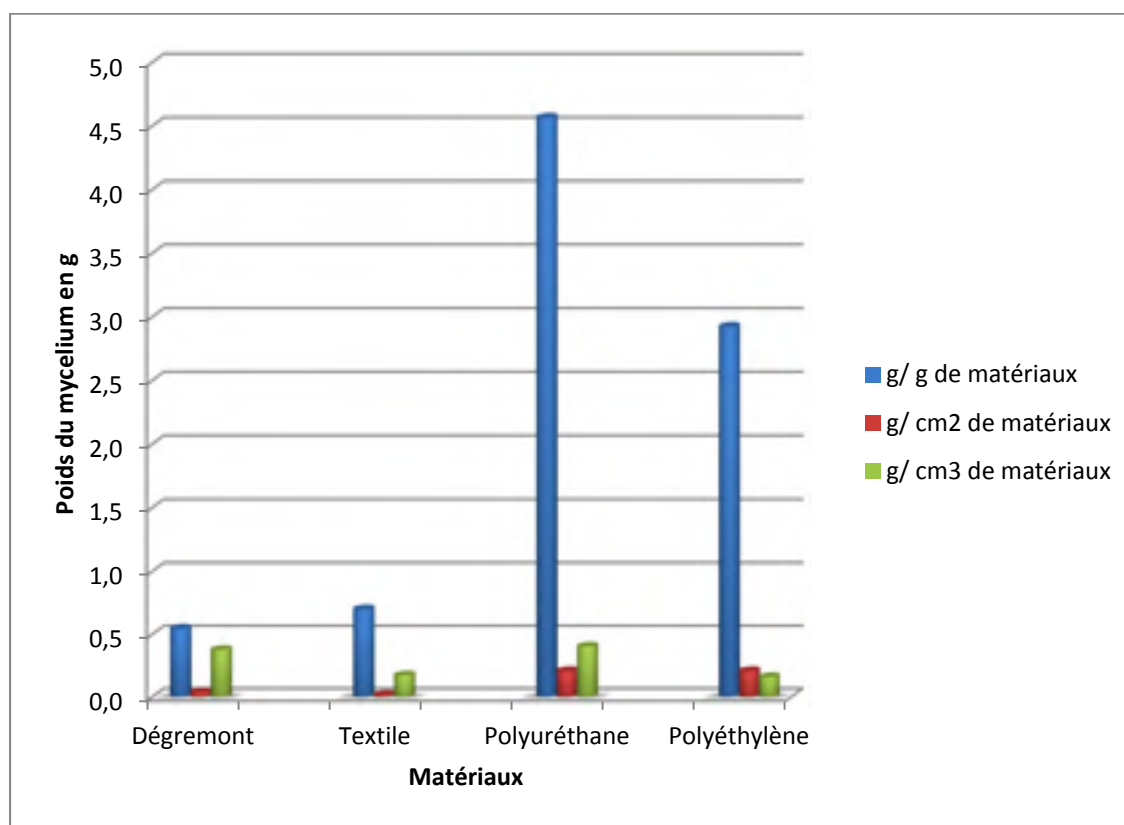


Figure 3.2 Estimation du poids de la biomasse fongique adhérent aux supports

### 3.2 Effets du support sur le traitement fongique et sur la production enzymatique

Cette section regroupe les différents effets que le support pourrait avoir sur le traitement fongique ainsi que sur la production enzymatique. La première partie évalue les effets du support au moyen de différents tests et effectué sur l'eau usée brute modifiée (EBM), l'eau usée brute modifiée et traitée avec greffons (AS), l'eau usée brute modifiée et traitée avec uniquement *P. chrysosporium* (SS) ainsi que sur leurs contrôles (contrôle avec support (CAS) et contrôle sans support (CSS)). La production enzymatique a été évaluée et effectuée

uniquement avec de l'eau usée brute modifiée et traitée avec les greffons (AS) et avec uniquement *P. chrysosporium* (SS).

### 3.2.1 Effets du support sur le traitement fongique

D'après les résultats présentés au tableau 3.1, il en ressort au bout de six jours de culture que le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* (SS) montre une meilleure dégradation des éléments tels que : le phosphore, le nitrate, et l'azote ammoniacal avec une consommation moyenne respective de 6 mg P-PO<sub>4</sub>/L, 11 mg-N/L et de 0,8 mg-NO<sub>3</sub>-L que le milieu traité avec les greffons (AS). Le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* (SS) présente également un pH plus acide ainsi qu'une alcalinité plus basse que les autres milieux. Cependant, les tests de DCO, DBO<sub>5</sub>, couleur et MES/MVES dénotent une meilleure dégradation pour le milieu (AS) que pour le milieu (SS).

Tableau 3.1 Comparaison entre le traitement effectué avec uniquement *P. chrysosporium* et celui effectué avec les greffons de *P. chrysosporium*

Paramètres	EUB	EUM	AS	SS	CAS	CSS
DCO (mg O <sub>2</sub> /L)	380	1250	44	60	420	1150
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /L)	180	360	28	47	150	280
Couleur (PtCo)	60	58	42	47	45	48
Alcalinité (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	250	260	190	160	240	230
pH	6,9	7,1	5,6	5,3	6,8	6,7
Phosphore (mg P-PO <sub>4</sub> /L)	6	26,3	18,6	16,1	23,9	22,1
Azote ammoniacal (mg-N/L)	25	26,8	4,4	1,1	15,6	15,6
Nitrate (mg-NO <sub>3</sub> -/L)	22	22,3	0,60	0,50	0,50	1,30
MES (mg/L)	250	240	140	550	200	239
MVES (mg/L)	240	190	90	350	185	200

**EUB** : eau usée brute, **EUBM** : eau usée brute modifiée, **AS** : avec support, **SS** : sans support,  
**CAS** : Contrôle avec support, **CSS** : Contrôle sans support

En somme, ces résultats indiquent que les supports de pastilles amélioreraient le traitement fongique et que le milieu traité sans support (SS) dégrade mieux le phosphore, l'azote ammoniacal et les nitrates. Cependant, il est à noter que le type de brassage n'a nullement fait l'objet d'étude lors de ce projet de recherche et qu'il était uniquement effectué qu'au moyen du bullage d'air. Ce paramètre a donc pu jouer un rôle important sur l'assimilation de ces composés par les champignons fixés sur les supports de pastilles (greffons). Concernant la baisse du pH et de l'alcalinité, les microorganismes présents dans le milieu de culture (greffons, bactéries) pourraient en être à l'origine. Ces derniers sécrètent des enzymes tels que les peroxydases (*P. chrysosporium*) possédant des groupements hydroxyle qui contribuent à acidifier le milieu. Ceci explique la baisse du pH et de l'alcalinité observée pour le milieu traité avec les greffons et le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* lors de l'étude. En effet, l'alcalinité passe de 230 mg CaCO<sub>3</sub>/L à 160 mg CaCO<sub>3</sub>/L pour le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* et de 240 mg CaCO<sub>3</sub>/L à 190 mg CaCO<sub>3</sub>/L pour le milieu traité avec les greffons. Le pH quant à lui passe de 6,8 à 5,6 pour le milieu traité avec les greffons et de 6,7 à 5,3 pour le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium*.

Les pastilles montrent également une certaine aptitude à s'opposer à la variation de pH donc à encaisser un choc acide. Cependant, le champignon étant actif à pH acide et le pH optimal variant en fonction de la température, il semblait nécessaire de déterminer la quantité de greffons, le pH, ainsi que la température adéquate afin de déterminer les limites d'action du système de traitement.

### 3.2.2 Quantification de la production enzymatique

Les figures A et B représentent la production enzymatique observée pour les milieux traités avec les greffons et les milieux traités avec uniquement *P. chrysosporium* et cela en fonction du temps et de la concentration en glucose. L'activité des enzymes ligninolytiques LiP et MnP a été mesurée sur le surnageant du milieu traité par les greffons et celui du milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* sur 7 à 10 jours de culture.

La production enzymatique du milieu contenant 1 % de glucose s'est déroulée sur 7 jours. La figure A montre que sa production débute au jour 2 avec un maximum de production observé pour le jour 3 suivi d'une phase de déclin débutant au jour 4. Cette phase de déclin au bout de 4 jours de traitement serait sûrement due à l'effet répresseur du glucose observé par Bonname, Perez et Jeffries (1991) sur certaines espèces de champignons de la pourriture blanche

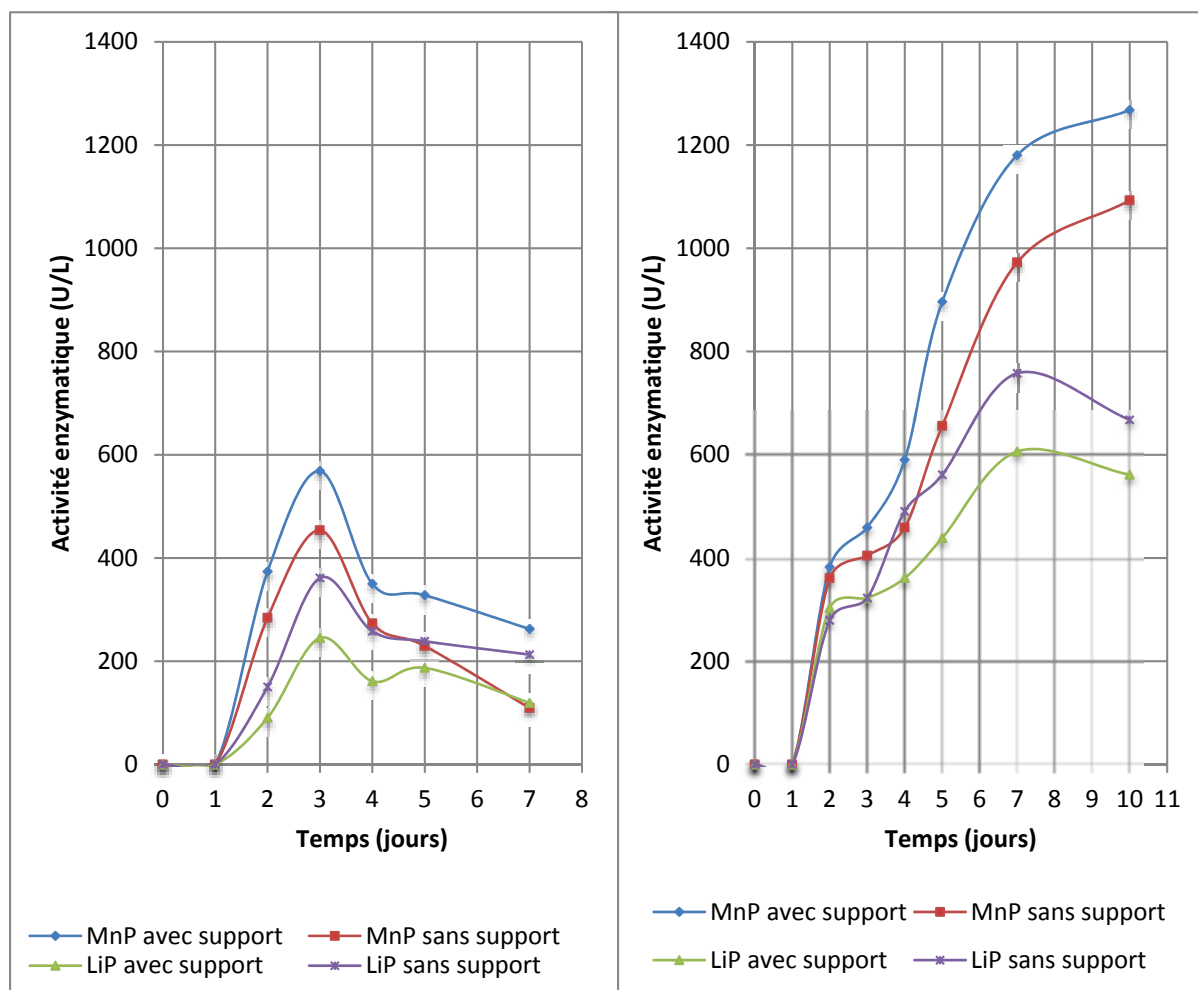
Le milieu contenant 0,1 % de glucose avait également une production enzymatique qui débutait au jour 2. Cependant, sa production enzymatique maximale a été enregistrée entre le 7<sup>e</sup> jour et le 10<sup>e</sup> jour de traitement. La concentration en glucose a donc un effet significatif sur la production enzymatique que ce soit pour la LiP ou la MnP. En effet, la production d'enzymes ligninolytiques est plus élevée pour le milieu contenant 0,1 % que celui contenant 1 % de glucose.

Il est également important de souligner que le milieu traité avec les greffons accuse une meilleure production enzymatique que le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* et cela quelque soit leur teneur en glucose. Cette amélioration pourrait s'expliquer par le fait que les greffons flottent à la surface du milieu à traiter ce qui a pour avantage d'accéder à plus d'oxygène que les champignons non fixés sur des supports.

En somme, ces résultats montrent qu'il est plutôt avantageux de fixer les champignons sur des supports inertes, car ces derniers amélioreraient la production enzymatique et aussi qu'un



milieu limitant en glucose permet une meilleure production enzymatique qu'un milieu à forte concentration en glucose. Ainsi, selon Rodriguez-Rincon et al. (2010), la production enzymatique pourrait fortement dépendre des conditions nutritionnelles, du substrat ou du milieu de culture.



A : Production enzymatique observée en fonction du temps à 1% de glucose

B : Production enzymatique observée en fonction du temps à 0,1% de glucose

### **3.3 Résultats de l'optimisation du traitement fongique**

Cette section regroupe les résultats des différents tests réalisés lors du criblage afin d'optimiser l'efficacité du traitement fongique. Il est aujourd'hui très bien établi que les conditions de culture affectent fortement l'efficacité du traitement fongique. Il était donc nécessaire de déterminer la quantité de greffons, le pH, ainsi que la température adéquate afin de déterminer les limites d'action du système de traitement.

#### **3.3.1 Effet de la quantité de greffons sur le traitement fongique**

La figure 3.3 représente la valeur résiduelle de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> obtenue après traitement et en fonction de la variation du nombre de greffons. Les résultats montrent qu'entre 50 et 75 greffons, il y a un important abattement de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> après 6 jours de traitement. En effet, la DCO passe des 1240 mg O<sub>2</sub>/L de départ à 66 mg O<sub>2</sub>/L (94 %) pour le milieu contenant 50 greffons tandis que le milieu contenant 75 greffons passe de 1244 mg O<sub>2</sub>/L à 44 mg O<sub>2</sub>/L (96 %). Il en est de même pour la DBO<sub>5</sub> qui accuse une DBO<sub>5</sub> de 47 mg O<sub>2</sub>/L après traitement du milieu contenant 50 greffons et de 28 mg O<sub>2</sub>/L pour le milieu traité avec 75 greffons. Cependant, l'efficacité du traitement est de moindre magnitude pour le milieu contenant 100 greffons. En effet, ce milieu traité accuse une plus forte DCO et DBO<sub>5</sub> que les milieux traités avec 50 et 75 greffons. Ceci a pu être expliqué par la mesure du pH du milieu comportant 100 greffons qui avoisinait le pH 6,0 pH auquel la production enzymatique de la souche n'est pas active (Bosco, Capolongo et Ruggeri, 2010) d'où une DBO<sub>5</sub> et une DCO plus élevée. Des contrôles ont été effectués durant l'expérimentation et dont les valeurs étaient de 580 mg O<sub>2</sub>/L pour la DCO et de 190 mg O<sub>2</sub>/L pour la DBO<sub>5</sub>

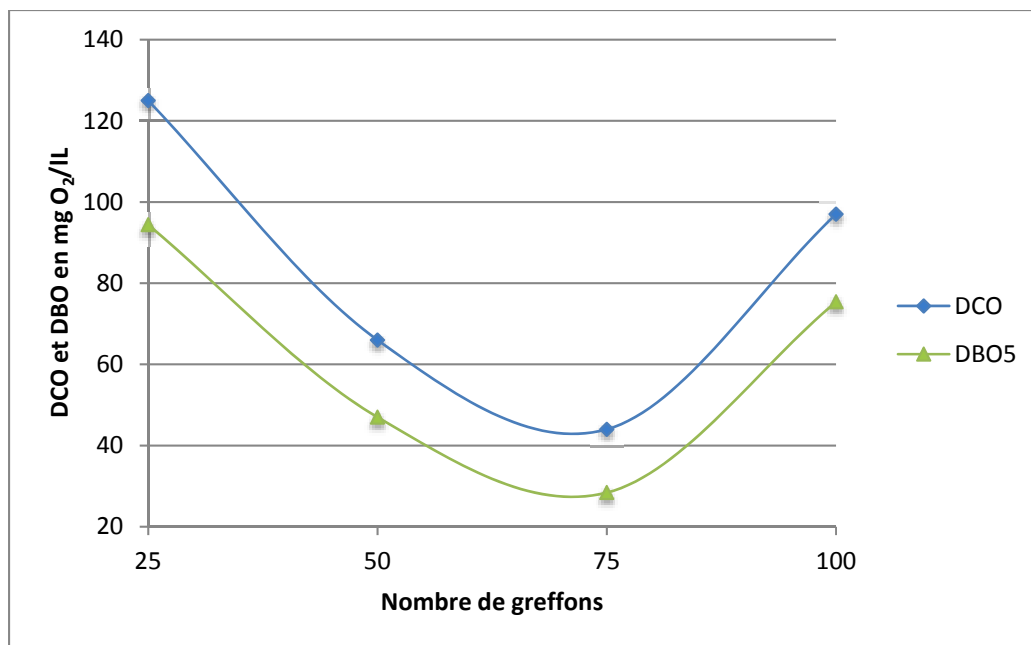


Figure 3.3 Valeur résiduelle de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> en fonction de la variation du nombre de greffons après 6 jours de traitement et à température ambiante

La figure 3.4 représente la valeur résiduelle de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> suite à l'utilisation de 25 greffons après six jours et après dix jours de culture. Le milieu passe de 122 mg O<sub>2</sub>/L après six jours de culture à 55 mg O<sub>2</sub>/L après dix jours de culture. Ceci correspond à environ l'équivalent de l'utilisation de 65 greffons pour traiter le milieu. Le temps a donc une incidence sur l'efficacité du traitement fongique et améliorerait donc la qualité de l'eau traitée.

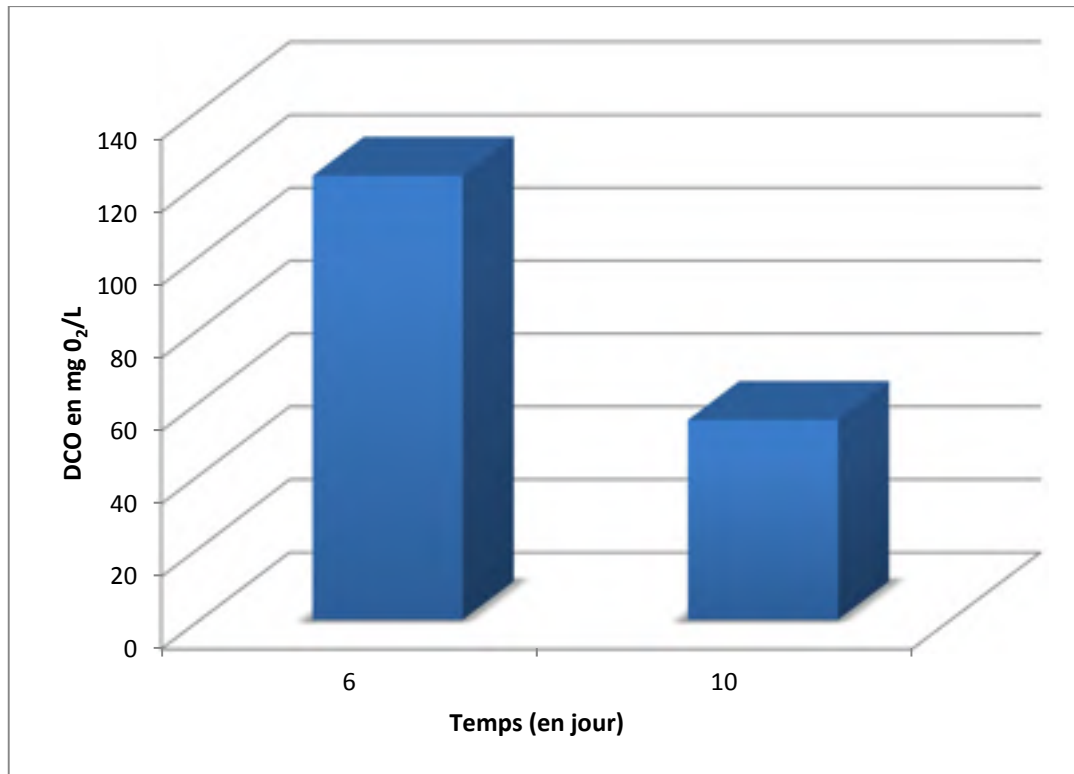


Figure 3.4 Valeur résiduelle de la DCO suite à l'utilisation de 25 greffons en fonction du temps et à température ambiante

Le tableau 3.1 présente les données de la mesure du pH après 6 jours de traitement fongique. Le pH est assez stable entre 50 et 75 greffons et plus bas pour le milieu contenant 25 greffons que pour le milieu contenant 100 greffons. Ainsi, plus il y a de greffons utilisés et plus le pH du milieu augmente.

Tableau 3.1 Variation du pH en fonction du nombre de greffons après 6 jours de culture et à température ambiante

Paramètres				
Nombre de greffons	25	50	75	100
pH	4,9	5,2	5,1	5,95

En somme, ces résultats montrent que l'utilisation de 50 à 75 greffons assurerait un meilleur taux d'abattement de la DCO et de la DBO<sub>5</sub>. En effet, (Asgher, Jamil et Iqbal, 2012) ont montré l'importance de déterminer la taille optimale de l'inoculum pour le processus de fermentation. De plus, Radha et al. (2005) ont rapporté qu'un niveau optimal de l'inoculum est nécessaire pour une meilleure production enzymatique. Cependant, l'utilisation de 25 greffons après 10 jours de traitement assurerait le même taux d'abattement que 65 greffons. La mesure du pH quant à elle a montré une variation croissante du pH en fonction de l'augmentation du nombre de greffons et que le pH devrait être contrôlé lors du processus de fermentation afin d'assurer un meilleur traitement fongique.

### **3.3.2 Effet du pH sur le traitement fongique**

Les résultats rapportés dans le tableau 3.2 montrent l'effet de la variation du pH sur l'enlèvement de la DCO avec et sans ajustement du pH du milieu ainsi que l'enlèvement de la DBO<sub>5</sub> effectué sans ajustement. Il est à noter que les ajustements ont été effectués journalièrement. Une baisse significative du pH de l'ordre d'une à deux unités a été enregistrée après six jours de culture pour tous les milieux non soumis à un ajustement journalier du pH.

Entre le pH 3,0 et le pH 4,0 une grande quantité de champignons se détachait des pastilles suite probablement à l'acidité trop forte du milieu qui a pu attaquer le support d'où la quantité de MES assez élevés pour ces derniers présentée dans le tableau 3.3. Il en est de même pour le milieu à pH 4,5, mis à part qu'un moindre détachement des champignons du support a été observé. Un plus grand abattement de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> a été enregistré pour les milieux à pH 5,0 et pH 6,9 non soumis à un ajustement du pH. En effet, le milieu à pH 5,0 montre une DCO de 66 mg O<sub>2</sub>/L et d'une DBO<sub>5</sub> de 45 mg O<sub>2</sub>/L tandis que le milieu à pH 6,9 présente une DCO de 44 mg O<sub>2</sub>/L et une DBO<sub>5</sub> de 25 mg O<sub>2</sub>/L. À première vue, comme le laisseraient croire ces résultats, un pH de 6,9 assurerait une meilleure efficacité de traitement fongique que le milieu à pH 5,0. Cependant, les milieux traités avec ajustement journalier du pH viennent contredire ces données. En effet, le milieu maintenu à pH 5,0 (44

mg O<sub>2</sub>/L) montre un plus grand abattement de la DCO que le milieu maintenu à pH 6,9 (93 mg O<sub>2</sub>/L). Cette expérience supplémentaire a révélé qu'un suivi du Ph est nécessaire ainsi que l'utilisation d'un milieu tampon mais aussi que le pH optimum pour un meilleur abattement de la DCO est d'environ de 5,0.

Tableau 3.2 Effet de la variation du pH sur le traitement fongique après 6 jours et à température ambiante

<b>pH du milieu</b>	<b>DCO sans ajustement du pH (mg O<sub>2</sub>L)</b>	<b>DCO avec ajustement du pH (mg O<sub>2</sub>L)</b>	<b>DBO<sub>5</sub> sans ajustement du pH (mg O<sub>2</sub>L)</b>
3,0	318	-	247
3,5	284	-	190
4,0	237	-	158
4,5	155	-	88
5,0	66	44	45
6,9	44	93	25

Tableau 3.3 Effet de la variation du pH sur les quantités de MES et MVES après 6 jours de traitement et à température ambiante

<b>pH du milieu</b>	<b>MES (mg/L)</b>	<b>MVES (mg/L)</b>
3,0	450	380
3,5	420	300
4,0	380	290
4,5	300	240
5,0	260	190
6,9	260	210

### 3.3.3 L'effet de la température sur le traitement fongique

Les résultats qu'illustre la figure 3.5 montrent la diminution de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> en fonction de la température après 6 jours de traitement fongique. Un abattement similaire est observé pour les milieux placés à 22,5°C et à 39°C (60 mg O<sub>2</sub>/L). Cependant, cet abattement est moins important que ceux observés entre 25 et 35°C.

Entre 25°C et 35°C, le traitement fongique était assez stable et l'abattement de la DCO passe de 45 mg O<sub>2</sub>/L à 22 mg O<sub>2</sub>/L tandis que celle de la DBO<sub>5</sub> passe de 29 mg O<sub>2</sub>/L à mg O<sub>2</sub>/L, d'où la forme de palier constaté sur le graphe. Cependant, l'abattement de la DBO<sub>5</sub> et de la DCO les plus élevés ont été observés pour le milieu placé à 35°C, cette température correspond donc à la température optimale qui assure un meilleur traitement fongique. Le milieu placé à 20°C avait sensiblement 300 mg O<sub>2</sub>/L de DCO et avait donc un abattement de la DCO moins important que les autres températures enregistrées. La température a sûrement ralenti la production enzymatique, d'où un moins fort abattement. En effet, à cette température, le champignon met plus de temps à croître et une activité enzymatique résiduelle proche de zéro a été rapportée par Bosco, Capolongo et Ruggeri (2010) à cette température et à pH 5,0.

En somme, les températures se situant entre 25°C et 35°C assuraient un traitement fongique assez stable. La température de 35°C correspond à la température optimale qui accuse un meilleur traitement fongique et enfin les températures de 22,5°C et 39°C assureraient une moins bonne efficacité du traitement fongique. Les températures inférieures à 20°C inhiberaient la croissance et la production d'enzymes fongiques en vue d'un traitement des eaux usées domestiques.

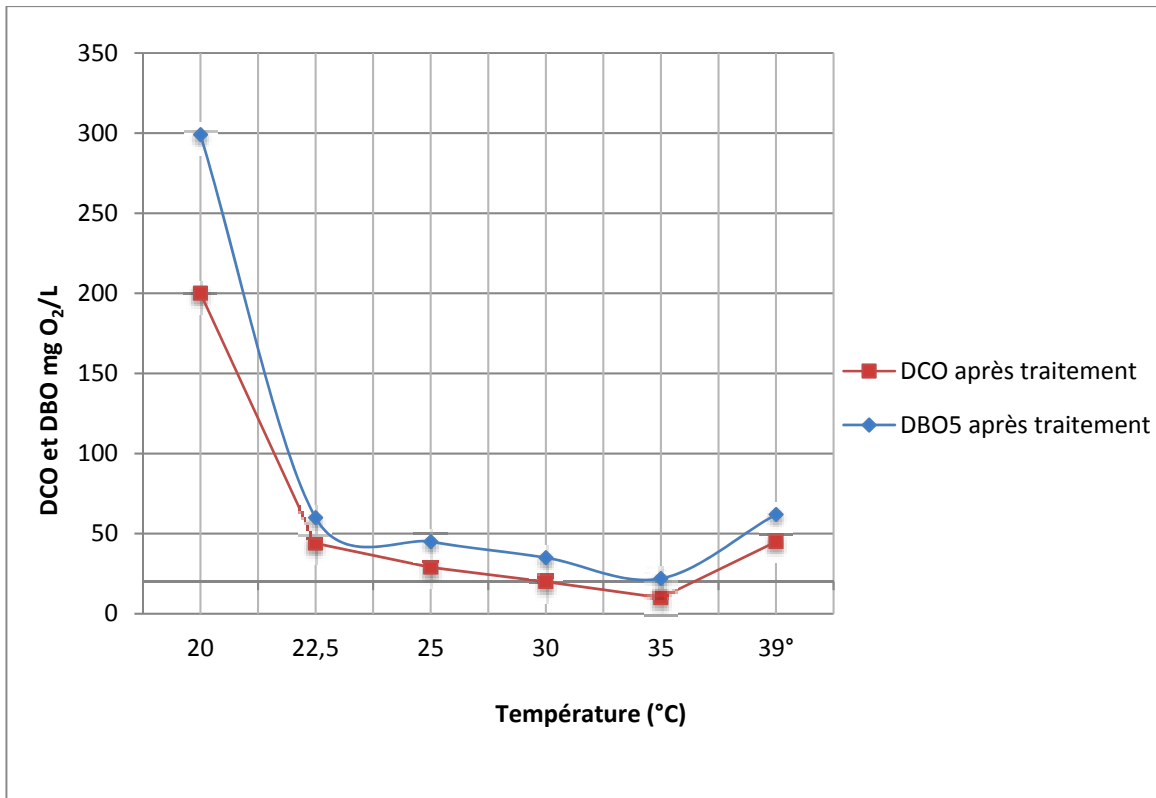


Figure 3.5 Valeur résiduelle de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> en fonction de la variation de la température et après 6 jours traitement fongique

### 3.4 Effet de la concentration en glucose, en azote et des médiateurs

L'efficacité du traitement et la production enzymatique peuvent fortement dépendre des conditions nutritionnelles, du substrat ou du milieu de culture (Rodriguez Couto et Sanroman, 2006). C'est dans ce cadre que la concentration en glucose, la source d'azote ainsi que la concentration en azote ont été évalués au cours de cette section.

Les figures 3.6, 3.7 et 3.8 représentent respectivement la DCO en fonction de la concentration en glucose, de la source en azote et de la concentration en fonction.



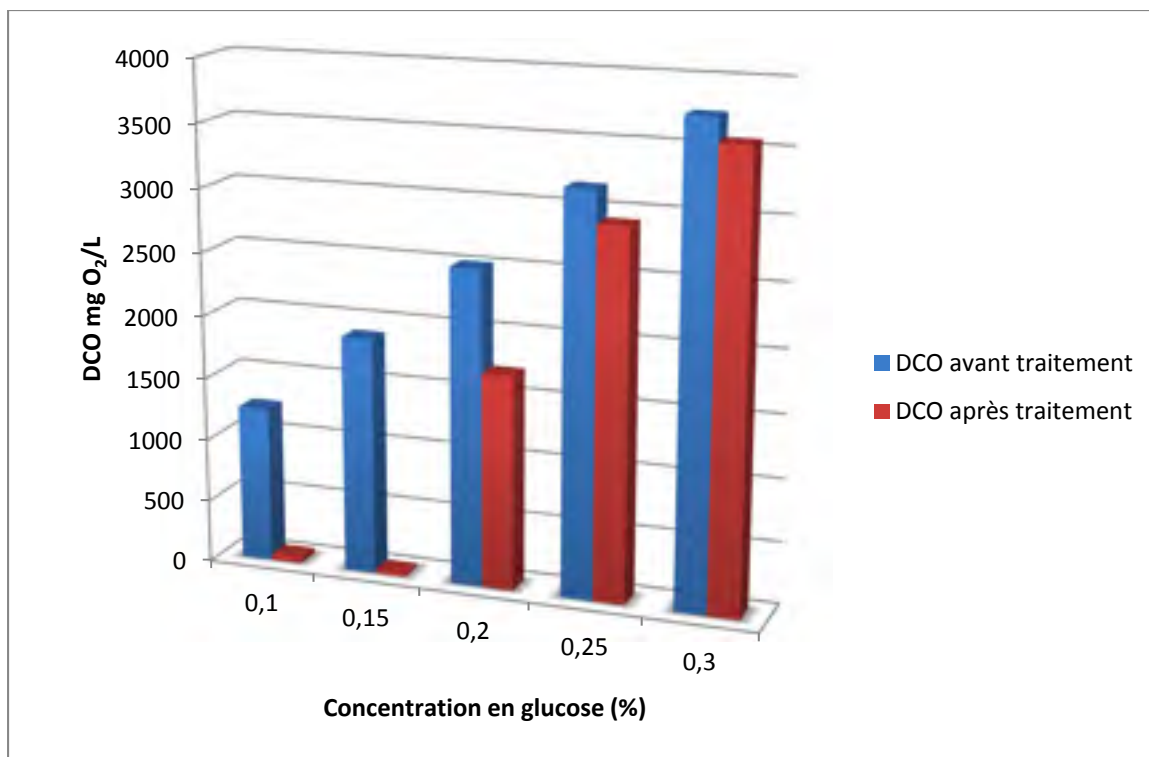
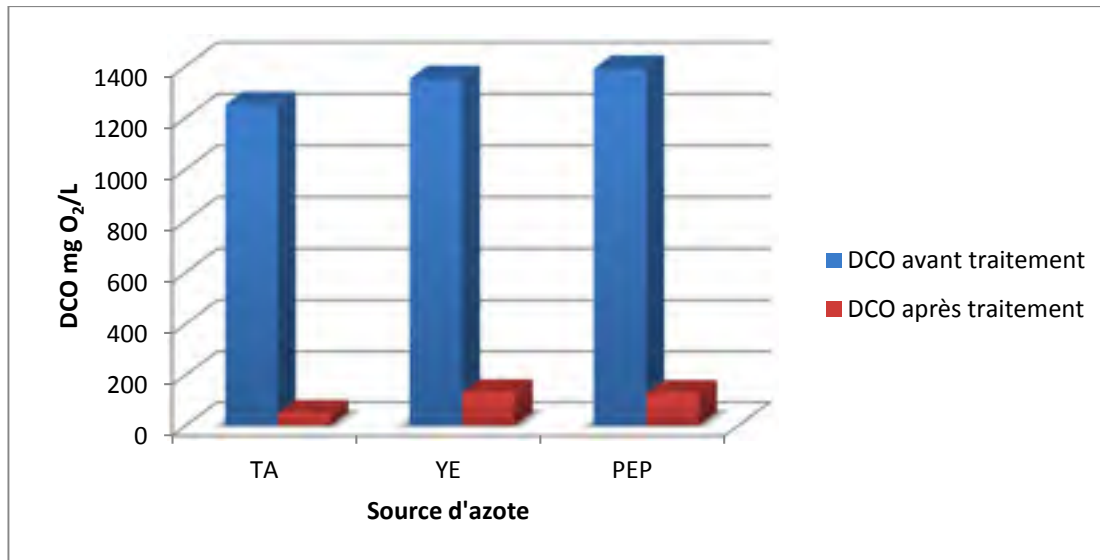


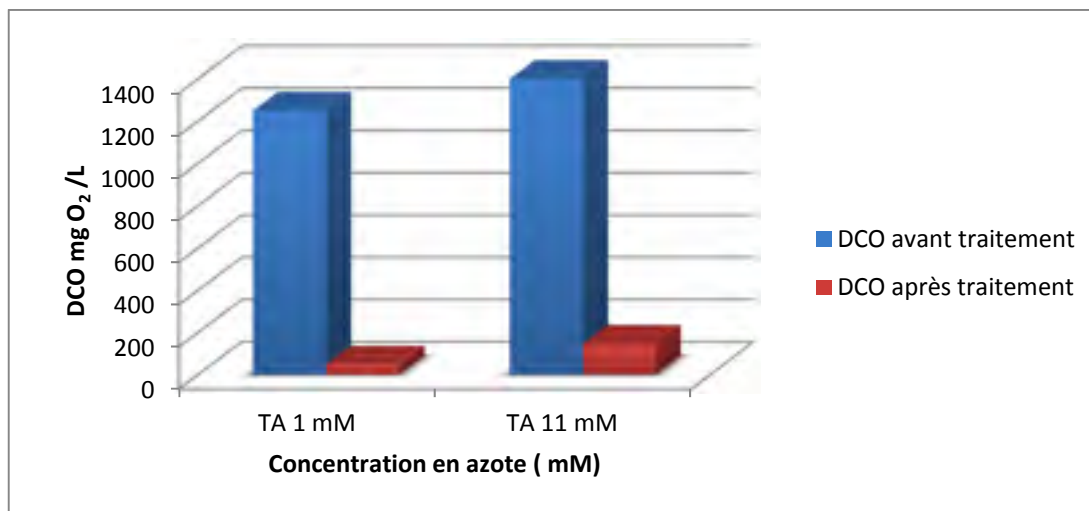
Figure 3.6 Comparaison entre la DCO avant et la DCO après 6 jours de traitement à température ambiante et en fonction de la concentration en glucose

L'expérience réalisée lors de variation de la concentration en glucose dans le milieu de culture a montré que le traitement fongique est plus efficace à des concentrations de glucose se situant entre 0,1 % et 0,15 % avec un meilleur abattement de la DCO observée pour le milieu contenant 0,15 % de glucose. Cependant, au-delà de cette concentration, soit entre 0,2 % et 0,3 % les milieux de culture traités étaient visqueux. Ceci est sûrement dû à la morphologie du mycélium qui change en fonction de la concentration en glucose. Aussi au fur et à mesure que la concentration en glucose augmente, l'abattement de la DCO est plus faible.



TA : tartrate d'ammonium, YE : extrait de levure, PEP : peptone

Figure 3.7 Comparaison entre la DCO avant et la DCO après traitement fongique en fonction de la source en azote

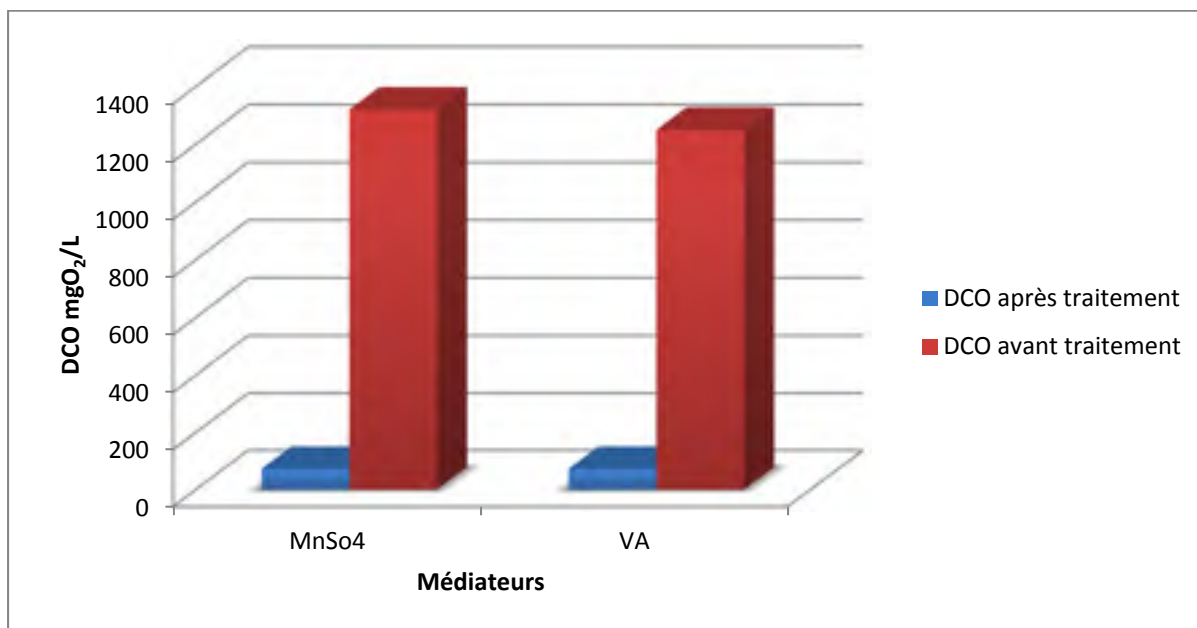


TA : tartrate d'ammonium

Figure 3.8 Comparaison entre la DCO avant et la DCO après traitement fongique en fonction de la concentration en azote

La figure 3.7 montre que le tartrate d'ammonium est la source d'azote préférée par *Phanerochaete chrysosporium* et que l'abattement de la DCO était similaire pour le peptone et l'extrait de Levure. Cependant, l'expérience menée sur la concentration en azote (figure 3.8) a montré que le milieu limitant en azote accusait un meilleur abattement de la DCO que

celui du milieu comportant une forte teneur en azote. Cependant, le milieu comportant une forte teneur en azote accusait quant à elle une meilleure croissance des champignons.



MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : Manganèse de sulfate hepta hydraté, VA : vératryl alcool

Figure 3.9 Comparaison entre la DCO avant et la DCO après six jours traitement fongique en fonction de l'ajout de médiateurs et placé à température ambiante

Il peut être constaté que l'ajout de MnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O de VA et le Tween 80 dans le milieu de culture n'a pas vraiment influé sur l'efficacité du traitement fongique. En effet, le milieu comportant le MnSO<sub>4</sub> passe de 1320 mg O<sub>2</sub>/L à 73 mg O<sub>2</sub>/L et le VA passe de 1250 mg O<sub>2</sub>/l à également 73 mg O<sub>2</sub>/L. Cependant, l'ajout de Tween 80 entraîne la formation de mousse lors de l'aération comme rapporté par Shim et Kawamoto (2002).



## CHAPITRE 4

### DISCUSSION

Ce chapitre présente les contributions de la recherche relative à l'objectif principal et aux trois sous-objectifs à savoir l'identification d'un support adéquat pour la fixation de *P. chrysosporium*, les effets des paramètres physiologiques et nutritionnels sur le traitement fongique effectués à l'aide des greffons de *P. chrysosporium*, ainsi que l'étude de l'effet des supports sur la production enzymatique à 0,1 et à 1 % de glucose. Les limites sont ensuite présentées ainsi que les recommandations quant à une exploitation future de la mycorémédiation en vue d'un traitement des eaux usées d'ordre domestique.

#### 4.1 Contributions de la recherche

Cette étude a permis de montrer qu'il est possible de traiter les effluents réels d'ordre domestique non stérilisée au moyen de greffons de *P. chrysosporium*. Elle a aussi permis de montrer qu'il est possible d'améliorer l'efficacité du traitement fongique en faisant varier différents paramètres physiologiques ou encore en ajustant l'apport nutritionnel nécessaire pour la croissance et la production d'enzymes ligninolytiques.

##### 4.1.1 Avantage de greffer *P. chrysosporium* sur biomatériaux

Le but des essais de greffage fongique sur biomatériaux était de vérifier que *P. chrysosporium* avait la capacité de se fixer à des supports de matières et de formes différentes. Ces essais étaient motivés par la possibilité que le champignon puisse adhérer aux supports. Bien que les résultats de l'immobilisation indiquent que les champignons aient poussé sur tous les supports, il en ressort que la forme et la surface totale disponible sur chacun des supports jouent grandement sur l'adhérence de la biomasse. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Shim et Kawamoto (2002) qui suggèrent également que la porosité ainsi que la rugosité de la surface de certains matériaux pourraient améliorer cette

adhérence. Shim et Kawamoto (2002) rapportent aussi que les cellules de *P.chrysosporium* en culture liquide et sans support sédimentent et ne synthétisent pas de LiP par manque d'oxygène. En effet, les cellules libres non fixés sont non réutilisables et seraient plus sensible aux agents dénaturant (Majeau, Brar et Tyagi, 2010). Celles immobilisées pourraient au contraire être protéger contre la dénaturation que pourraient causer les co-solvants organiques. Elles permettraient également de faciliter la séparation des produits de réactions (Duran, 2002) de maintenir une bonne efficacité catalytique sur plusieurs cycles de réaction (Palmieri, 2005) et les enzymes des cellules immobilisées seraient beaucoup plus stables (D'Annibale, 2000) . Cela montre les avantages d'immobiliser les cellules de *P. chrysosporium* sur des supports inertes. Toutefois, il est important de prendre connaissance de la morphologie du support pour optimiser l'immobilisation (diamètre des pores, la chimie du groupement d'ancrage, la densité). Certaines astuces peuvent aider à déterminer le type de matériaux à utiliser à des fins d'immobilisation des microorganismes tel que le type de traitement envisagé (aérobie, aéro-anaérobie facultatives et anaérobie). En effet, un test préliminaire pourrait être effectué sur les matériaux afin de déterminer la gravité spécifique : il suffit de plonger le matériau dans le milieu à traiter et regarder s'il a tendance à couler, à stagner au milieu ou encore à flotter à la surface. Dans le cadre de cette étude ayant plutôt recours au traitement aérobie, les matériaux qui flottent à la surface sont privilégiés.

## **4.2 Paramètres physiologiques influençant l'efficacité du traitement**

Le procédé de traitement développé et testé dans le cadre de ce projet a permis de montrer que les paramètres physiologiques affectent grandement l'efficacité du traitement fongique comme rapporté dans la littérature.

### **4.2.1 Quantité de greffons**

Premièrement, l'étude de la variation de la quantité de greffons a permis de montrer qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser de grandes quantités de greffons pour assurer un meilleur traitement fongique. En effet, selon Asgher, Jamil et Iqbal (2012), l'éviction des spores

pourrait provoquer l'épuisement des nutriments et inhiberait le développement et la croissance fongique durant le processus de traitement fongique.

Deuxièmement, les tests effectués sur l'utilisation de 25 greffons en fonction de l'augmentation du temps de traitement fongique ont montré qu'une petite quantité de greffons pourrait bien assurer un bon traitement fongique et même rentrer dans la limite des 50 à 75 greffons nécessaire pour un meilleur traitement fongique qu'à établit cette étude. Cependant, ils nécessiteraient plus de temps pour assurer le même traitement que 50 à 75 greffons.

Troisièmement, la mesure du pH après 6 jours de traitement fongique a permis d'établir qu'un contrôle du pH était nécessaire pour travailler dans des conditions de stabilité du pH. En effet, Galhaup et al. (2002); Gao, Wen et Qoam (2006) ont affirmé que lorsque le pH n'est pas contrôlé durant la fermentation, une diminution du pH de la culture se produit lors de la phase de croissance ou lors de la phase de production enzymatique, et ceci serait associée à la libération d'enzymes ligninolytiques et d'autres facteurs acides excrétés. Cependant, dans le cadre de la présente étude, un contrôle du pH n'était pas nécessaire. En effet, l'objectif primaire était d'abord de vérifier que les greffons avaient bel et bien la capacité de traiter une eau usée d'ordre domestique. Ensuite, venait l'établissement des limites d'actions des greffons.

Il en sort que le champignon *P. chrysosporium* a démontré la capacité de s'adapter à ce milieu hostile et d'acidifier le milieu afin de pouvoir produire ses enzymes ligninolytiques, puisqu'il a été établi dans la littérature que ce champignon est actif à des pH légèrement acide se situant entre 4,5 et 5,5 (Majeau, Brar et Tyagi, 2010).

#### **4.2.2 pH**

Lors de la pratique expérimentale de la variation du pH, l'acide succinique n'a pas été utilisé pour réajuster le pH du milieu comme le suggéraient les méthodes proposées par Asgher,

Jamil et Iqbal (2012); Ming et Kent (1988); Shim et Kawamoto (2002). Car l'acide succinique n'a pas réussi à baisser le pH de l'eau usée brute, sûrement due à la forte alcalinité de cette eau qui était de 260 mg CaCO<sub>3</sub>/L. Il est cependant important de spécifier que ces auteurs ont tous travaillé soit avec de l'eau distillée dans laquelle des nutriments et un polluant spécifique ont été ajoutés afin d'évaluer le taux de dégradation du polluant en question ou encore de l'eau usée diluée et préalablement stérilisée dans laquelle des nutriments sont également additionnés.

L'étude des effets du support sur le traitement fongique, a permis de montrer que les pastilles ont une certaine aptitude à encaisser un choc acide. En effet, plus il y a de pastilles utilisées et moins il y a de variation du pH observée par rapport au pH de départ qui est de 6,9. Ceci pourrait être considéré comme un avantage puisqu'en fin de compte, Ce procédé ne requerrait pas une grande quantité de greffons pour assurer un meilleur traitement fongique encore moins la nécessité d'acidifier préalablement le milieu de culture. Toutefois, en terme d'assimilation des nutriments (phosphore, azote ammoniacal, nitrate) par *P. chrysosporium* fixé sur les pastilles (greffons), une meilleure assimilation a été observée pour le milieu traité avec uniquement *P. chrysosporium* que pour le milieu traité avec les greffons. En effet, *P. chrysosporium* est directement inoculé dans l'eau brute usée modifiée pour le milieu traité contenant uniquement *P. chrysosporium* (SS) tandis que pour le milieu traité avec les greffons (AS), les supports empêchent l'accès direct au nutriment. Néanmoins une meilleure dégradation de ces éléments pourrait être obtenue par l'étude d'un système de brassage approprié pour ce type de traitement.

En ce qui concerne le pH, les tests complémentaires effectués avec ajustement du pH toutes les 24 h a permis d'établir que le pH optimum est d'environ de 5,0 pH auquel la production enzymatique serait maximale pour *P. chrysosporium* comme rapporté par certains auteurs.



### **4.2.3 La température**

L'étude de la variation de la température a quant à elle permis d'établir une plage d'action de 25°C à 35°C pour une meilleure efficacité du traitement fongique et dont l'optimum de 35°C. En effet, plusieurs auteurs tels que Hai, Yamamoto et Fukushi (2006); Swamy et Ramsay (1999) affirme qu'une grande variété de champignons de la pourriture blanche a une température optimale qui varie entre 25 °C et 37 °C. Cependant, lors d'une application réelle de la mycorémédiation sur les eaux usées d'ordre municipale au Québec, cette entreprise pourrait ne pas être viable à cause des dépenses énergétiques que pourrait nécessiter le procédé surtout en période hivernale. Néanmoins, le test complémentaire effectué à 22,5°C a permis de montrer qu'une dégradation de la DBO<sub>5</sub> et de la DCO était possible à cette température.

## **4.3 Effet de l'apport nutritionnel sur le traitement fongique.**

### **4.3.1 Glucose**

#### **– Effet de la concentration en glucose sur le traitement fongique**

L'étude de la concentration en glucose a permis de montrer que le traitement est plus efficace en milieu limitant en glucose qu'en milieu fortement glucose. Il a également été observé macroscopiquement que la morphologie du champignon change en fonction de la concentration en glucose. Cependant, une étude microscopique du champignon après traitement et en fonction de la concentration en glucose n'a pas été établit.

#### **– Effet de la concentration en glucose sur la production enzymatique**

Dans le cadre de ce projet, l'étude de différentes sources de carbone sur le traitement fongique n'a pas été établit. Seul le glucose constituait la principale source de carbone.

Les tests évaluant la concentration en glucose sur la production enzymatique, a également mis en évidence qu'il y avait davantage de production d'enzymes en milieu limitant en glucose qu'en milieu fortement glucosé et aussi, la production enzymatique est nettement plus élevée pour les greffons que pour les champignons non fixé sur les supports. Ces résultats vont dans le sens des résultats obtenus par Shim et Kawamoto (2002) qui affirment que suite à l'étude de la production enzymatique de *P. chrysosporium* fixés sur support, les supports amélioreraient la production enzymatique avec un haut niveau d'activité. Dans cette étude, comme dans plusieurs autres études portant sur l'évaluation de la production enzymatique, l'activité MnP s'est avérée plus élevée que l'activité LiP (Asgher, Jamil et Iqbal, 2012; Hodgson, 1998). De plus, une concentration limitante en glucose induirait une meilleure production enzymatique qu'une forte concentration en glucose (Galhaup et al., 2002; Thiruchelvam et Ramsay, 2007). Rodriguez Couto et Herrera (2006) ont démontré que l'ajout séquentiel de différentes sources de carbone tels que le glucose suivi par le glycérol provoquerait une augmentation du taux de production enzymatique chez *T. hirsuta* par rapport au glucose utilisé comme seule source de carbone. Cependant, pour de nombreux champignons, le glucose serait le répresseur typique de certaines enzymes telle que la laccase tandis qu'un minimum semble essentielle pour maintenir la viabilité de la culture fongique et soutenir la production enzymatique au fil du temps (Majeau, Brar et Tyagi, 2010). Cela rend la concentration optimale en source de carbone assez ambiguë.

### 4.3.2 Azote

#### – Effet de la source d'azote

Les tests effectués sur la source d'azote assurant un meilleur abattement de la DCO ont montré que le tartrate d'ammonium était la source d'azote préférée par *Phanerochaete chrysosporium* et que l'abattement de la DCO était similaire pour la peptone et l'extrait de Levure. Cependant, en pratique, l'utilisation du tartrate d'ammonium provoquerait des problèmes environnementaux, car ce dernier est un produit toxique pour l'environnement. Néanmoins, il serait intéressant de suivre l'évolution de ce produit afin d'observer si le

tartrate d'ammonium est plutôt assimilé par le champignon ou si il est toujours présent dans le milieu de culture.

#### – Effet de la concentration en azote

Concernant la concentration en azote, le milieu limitant en azote permet un meilleur abattement de la DCO que celui du milieu comportant une forte teneur en azote. Cependant, le milieu comportant une forte teneur en azote montrait quant à lui une meilleure croissance des champignons. En effet, il a été établi dans la nature que la production d'enzyme ligninolytiques est améliorée dans les conditions limitant en azote. Pour plusieurs espèces différentes de champignons, l'activité ligninolytique commence après épuisement de la concentration élevée en azote initial dans le milieu de culture (Majeau, Brar et Tyagi, 2010). En somme, un milieu limitant en azote serait un facteur déterminant dans l'amélioration de la production d'enzymes ligninolytiques. Cependant, lors d'une application réelle, l'ajout de glucose et d'azote n'est pas nécessaire puisque l'eau usée en contient déjà une quantité suffisante.

#### 4.3.3 Médiateurs

Les médiateurs tels que le  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et le VA et le Tween 80 ont fait l'objet d'étude dans le cadre du présent projet. L'ajout de 1 mM de  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  et de 1 mM de VA ainsi que 0,05 % de Tween 80 dans le milieu de culture n'a pas vraiment influé sur l'efficacité du traitement fongique. Cependant, il aurait été intéressant d'effectuer des tests portant sur l'effet des médiateurs sur la production enzymatique. Néanmoins, Shim et Kawamoto (2002) soutiennent que l'ajout de 40 mM de VA et de 0,05 % de Tween 80 augmenteraient l'activité enzymatique. Ils ont constaté que l'effet des deux suppléments était à peu près égale.

La présente étude a montré que l'utilisation du Tween 80 en tant que supplément entraîne la formation significative de mousse due à l'aération comme rapporté par (Shim et Kawamoto,

2002). L'ajout de médiateur améliorerait l'efficacité d'oxydation des polluants. Cependant, dans la pratique, l'utilisation de médiateurs artificiels n'est pas réalisable en raison de leurs coûts élevés. La toxicité potentielle que peut avoir leurs sous-produits rend impossible le recyclage de ces éléments. En outre, les médiateurs polymérisés peuvent former un précipité noir conduisant à une coloration résiduelle des eaux (Majeau, Brar et Tyagi, 2010). Ainsi l'idée de les substituer avec des médiateurs naturels devrait être étudiée. Il est aujourd'hui établi que certains composés générés lors de la biodégradation de la lignine de la pourriture blanche peuvent agir comme médiateurs naturels. Ces médiateurs naturels pourraient être obtenus à partir de la lignine riche en éléments syringiques tels que l'eucalyptus et les plantes non ligneuses (Kirk et Farrell, 1987). Cependant, tous les médiateurs d'origines naturelles ne doivent pas être automatiquement considérés sans risque. En effet, l'effet de la cytotoxicité de l'acide 4-hydroxybenzoïque, un métabolite naturel excrété par les champignons, s'est révélé très toxique pour les fibroblastes de souris (Majeau, Brar et Tyagi, 2010).

#### **4.4 Évaluation de l'efficacité du traitement fongique par *P. chrysosporium***

La plupart des expériences portées sur la biorémédiation des eaux usées ont été réalisées avec de l'effluent stérilisé ou de l'eau distillée comportant des nutriments et un polluant donné à dégrader. Cependant, le choix de travailler directement avec de l'eau usée non stérilisée, tout au long de cette étude, était animé par l'idée de simuler les conditions réelles de traitement et l'hypothèse que les bactéries indigènes peuvent coopérer avec le champignon *P. chrysosporium* améliorant ainsi l'efficacité du traitement fongique. Ainsi, les résultats obtenus lors de la pratique expérimentale fournissent une idée des résultats qui pourraient être obtenus réellement sur les eaux de mêmes caractéristiques traitées avec *P. chrysosporium*.

##### **4.4.1 Estimation de la biomasse fongique après traitement**

Lors du traitement fongique, l'estimation de la croissance de la biomasse fongique n'a pas été établie, car la présence des matières en suspension (MES) dans l'eau usée rendait cette

entreprise difficile à mener. En effet, il a été constaté lors de la pratique expérimentale que les MES avaient tendance à se fixer sur les supports, car les champignons fixés sur les pastilles avaient un aspect colloïdal favorisant cette adhérence d'où la diminution des MES observée dans les eaux usées après traitement. De plus, à pH très acide, les champignons se détachent du support. Ceci entraîne des pertes d'où une augmentation de la quantité de MES observée pour ces milieux. En somme, ces facteurs induiraient une sur ou sous-estimation de la croissance de la biomasse fongique réelle.

#### 4.4.2 Caractéristiques de l'eau usée traitée

Le tableau 4.1 récapitule les principales propriétés physicochimiques des eaux usées municipales traitées au moyen des greffons de *P. chrysosporium* ainsi que les exigences réglementaires relatives aux normes de rejets d'effluents dans le milieu hydrique. Les conditions ayant permis d'obtenir les résultats de l'eau usée traitée par les greffons étaient les suivantes : le milieu de culture était placé à température ambiante ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ) pendant six jours, au pH du milieu ambiant et additionné 0,1 % de glucose ainsi que de 50 mL de la solution de basal III.

Tableau 4.1 Comparaison entre l'eau usée traitée par les greffons et les normes de rejets réglementaires

Paramètres	Eau usée brute	Eau usée brute modifiée	Eau usée brute modifiée traitée par les greffons	Normes de rejet
DCO mg-O <sub>2</sub> /L	390	1200	25	-
DBO <sub>5</sub> mg-O <sub>2</sub> /L	180	350	10	25 (partie carbonée)
pH	7	7	5,6	6-9
MES mg/L	255	250	140	25
Phosphore mg P-PO <sub>4</sub> /L	5	26	16,1	≤ 1
Azote ammoniacal mg-N/L	26	26	1,12	1,25

La comparaison des résultats des paramètres physico-chimiques de l'eau usée traitée par les greffons avec les normes de rejet réglementaire montre un rendement d'épuration de 98 % d'enlèvement de la DCO, de 97 % pour la DBO<sub>5</sub>, de 44 % pour les MES et de 95,6 % de l'ammoniac. Cependant, ces rendements ne satisfont qu'en partie les normes de rejets imposés. En effet, mis à part la DCO, la DBO<sub>5</sub> et l'azote ammoniacal, les autres paramètres ne respectent pas les normes. Néanmoins, une étape de filtration ou de décantation des MES serait préalablement nécessaire avant leur rejet dans le milieu hydrique pour répondre aux exigences. Concernant le pH, un réajustement serait également nécessaire pour répondre aux exigences de rejet. La quantité de phosphore quant à elle, dépasse de 16 fois la quantité réglementaire. Un traitement spécifique du phosphore s'avèrerait nécessaire afin de respecter les exigences réglementaires en vigueur.

Il faut rappeler que de tels rendements ont été obtenus après six jours de traitement fongique et donc pas réalisables en pratique. Ceci qui constitue la première grande contrainte. De plus, l'ajout de nutriment tels que le glucose, le phosphore, ou d'azote s'est avéré non nécessaire compte tenu des objectifs de traitement fixés au départ puisque l'eau usée brute en contient déjà une certaine quantité. Cependant, Il aurait été intéressant de vérifier l'efficacité du procédé sur l'eau usée brute sans ajout de nutriment et aurait également été pertinent d'effectuer des tests d'écotoxicité avec des daphnés ou des truites arc en ciel sur l'eau usée traitée avec les greffons de *P.chrysosporium* comme stipulé dans les normes de rejet.

En somme, le potentiel de biorestauration de *P.chrysosporium* pourrait être amélioré par une optimisation minutieuse des paramètres physiques et nutritionnels. Cependant, il serait intéressant d'effectuer des tests en bioréacteur en alternant temps d'induction de croissance et temps de traitement fongique afin d'induire continuellement la production enzymatique. Il aurait également été intéressant de vérifier l'efficacité du procédé en effectuant des *batch* répétés tout en utilisant les mêmes greffons.

La possibilité que *P. chrysosporium* dégrade les métaux lourds pourrait également être exploré car il a été observé lors de cette étude, que ce champignon avait la capacité de dégrader le papier d'aluminium (voir photos à l'annexe 4) .





## CONCLUSION

L'application de technique de mycorémédiation en vue de traiter des eaux usées semble être une entreprise difficile à mener à cause de leur contenance en divers micropolluants qui pourraient inhiber le processus de traitement. C'est en raison du manque de connaissances sur les perturbations que pourraient occasionner le mélange de micropolluants contenu dans les eaux usées réelles, sur le processus de mycorémédiation que la présente étude a été menée. En effet, ce projet avait pour but principal d'évaluer l'efficacité du traitement fongique en usant d'eau usée d'origine domestique. Le premier objectif consistait à fixer *P. chrysosporium* à différents supports inertes de matière et de formes différentes. Les résultats ont montré que tous les supports ont été colonisés par le champignon. Néanmoins, il semblerait que la surface disponible, la rugosité ainsi que la matière du support jouent un grand rôle sur son adhérence. Le second objectif était de faire varier différents paramètres afin de déceler les limites d'actions du procédé. Les résultats ont révélé qu'établir le nombre de greffons, la température et le pH d'action était primordial. En effet, les résultats ont montrés que 50 à 75 greffons, une température de 25°C à 35°C et un pH variant entre 4 et 5,5 étaient nécessaires pour traiter 500 mL d'eau usée. En dessous et au-delà de ces valeurs, le traitement n'était plus aussi efficace. Les résultats ont également montré pu être observé que l'épuration était plus efficace en milieu limitant en azote, qu'en milieu hautement azoté. Les concentrations entre 0,1 % et 0,15 % de glucose se sont avérées plus adéquates pour une meilleure épuration de l'eau usée qu'au-delà de ces concentrations. L'ajout des médiateurs tels que le  $MnSO_4$  et l'alcool vératrylique n'avait pas vraiment d'effet sur le traitement fongique de l'eau usée domestique mais d'après la littérature, il augmenterait la production enzymatique. Le troisième objectif était de mesurer la production enzymatique du champignon avec et sans support. Les résultats ont montré que la présence du support permettait d'obtenir une meilleure production enzymatique que sans support.

En somme, il ressort au terme de cette étude que l'eau usée traitée avec *Phanerochaete chrysosporium* montre au bout de six jours de traitement des caractéristiques similaires en terme d'attente moyenne en DCO, DBO<sub>5</sub> et d'azote ammoniacal à celles des eaux usées

traitées de la station d'épuration de La Prairie. Il en sort également que l'eau usée obtenue après traitement par ce procédé respecterait les normes de rejet dans l'environnement après exploitations de certaines recommandations proposées précédemment. Cependant de tels temps de traitement des eaux n'existe pas dans les stations d'épurations et il faudrait donc penser à développer un système en continu avec des cycles de 15 h de traitement comme celle établi pour traiter les eaux usées de la ville de la Prairie.—

## ANNEXE I

### COMPOSITION DU MILIEU BASAL III ET DES ÉLÉMENTS EN TRACES

Produits	Concentrations de la solution mère (g/L)
Basal III	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20
MgSO <sub>4</sub>	5
CaCl <sub>2</sub>	1
Éléments en traces	
NaCl	1
MnSO <sub>4</sub>	0,5
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10 <sup>-2</sup>
COCl <sub>2</sub>	0,1
CuSO <sub>4</sub>	0,1
AKL (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . 12H <sub>2</sub> O	10 <sup>-2</sup>
Na <sub>2</sub> MOO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 <sup>-2</sup>
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1
Nitriлотriacétate	1,5



## ANNEXE II

### PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PEROXYDASE DE LA LIGNINE

Tirée de (Hodgson, 1998)

En présence de  $H_2O_2$ , la peroxydase de lignine (LiP) s'est avéré avoir la capacité d'oxyder l'alcool vératrylique (alcool 3,4 diméthoxybenzylique) en véatraldéhyde TIEN et KIRK (1984). Cette réaction sert de base à la définition de l'activité enzymatique de la LiP, car par définition, la production de 1  $\mu\text{mol}$  de véatraldéhyde peut être catalysée par une 1 unité d'activité (U) par minute à une température de  $30^\circ\text{C}$ . Lors d'un dosage enzymatique LiP, l'échantillon à analyser est mis en présence du substrat (AVE) et d'un tampon tartrate. Par la suite, l'ajout de  $H_2O_2$  déclenche la réaction puis le taux initial de formation du produit de réaction est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 310 nm (taux d'accroissement de l'absorbance).

Le protocole à suivre est décrit ci-dessous :

Dans des cuvettes en quartz de 1 mL, ajouter les solutions suivantes :

Tampon tartrate pH 3,0	740 $\mu\text{L}$
Échantillon (voir table de dilution)	400 $\mu\text{L}$
Alcool vératrylique	40 $\mu\text{L}$
$H_2O_2^*$	20 $\mu\text{L}$

\*La lecture débute immédiatement après avoir ajouté le  $H_2O_2$ .

#### Préparation des solutions

Tampon tartrate pH 3 : peser 2,48 g d'acide L-tartrique (150 g/mol), puis compléter à 100 mL avec de l'eau distillée ensuite ajuster le pH à 3,0 avec du NaOH concentré.

Alcool vératrylique : peser 1,01 g d'alcool vératrylique (168 g/mol), puis compléter à 100 mL avec de l'eau distillée.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: introduire 93 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % dans un ballon de 50 mL puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

### Facteurs multiplicatifs

Les différents facteurs multiplicatifs associés au taux d'accroissement de l'absorbance selon la dilution de l'échantillon sont répertoriés dans tableau A1 :

Tableau A1 Facteurs multiplicatifs du calcul de l'activité LiP

Dilution	Volume d'échantillon (µL)	Volume d'eau (µL)	Facteur multiplicatif
1	400	0	323
1/2	200	200	645
1/4	100	300	1290
1/10	40	360	3226

### Explication des facteurs multiplicatifs pour le dosage de la LiP.

Après avoir introduit le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'échantillon à analyser, l'oxydation de l'alcool vératrylique démarre immédiatement si ce dernier possède une activité LiP. Dans ce cas, la valeur de l'absorbance à 310 nm (abs) croît d'une façon linéaire pour un certain laps de temps. Cette valeur l'absorbance permet de quantifier un maximum d'absorbance du produit de la réaction. La pente de cette courbe est calculée (d'une façon automatique par le spectrophotomètre) et permet d'obtenir la valeur R<sub>abs</sub> (taux d'accroissement de l'absorbance) qui est exprimée en unité d'absorbance/minute. Il est stipulé par la loi de Beer que la concentration d'une substance dans une solution (C) est proportionnelle à l'absorbance mesurée à la longueur d'onde maximale de cette substance (310 nm pour le vératraldéhyde). La loi de Beer s'écrit comme suit :

$$C = \frac{abs}{9300 \times l} \quad \text{Équation 1}$$

où: C : concentration d'un composé (mol/L)

abs : absorbance mesurée par spectrophotométrie

em : coefficient d'extinction molaire de la substance (qui doit être indépendant de la concentration pour que la substance obéisse à la loi de Beer); pour le véatraldéhyde, em = 9300 (mol/L)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

l : distance parcouru par la lumière au travers de l'échantillon (cm); pour les cuvettes utilisées, l = 1 cm.

Le taux d'accroissement de l'absorbance peut être transformé en taux d'accroissement de la concentration au moyen de la loi de Beer (équation 1).

$$Rc = \frac{Rabs}{(em \times l)} = \frac{Rabs \times l \times 106}{9300 \times l}$$

$$Rc = Rabs \times 107,52$$

Où Rc : taux d'accroissement de la concentration de véatraldéhyde (μmol.L<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>) dans la solution contenue dans la cuvette. Par définition, Rc représente la concentration en unité d'activité (U/L) du contenu de la cuvette d'essai (à ne pas confondre avec celle de l'échantillon testé, qui a été dilué par l'ajout des réactifs nécessaires au dosage).

Rabs : taux d'accroissement de l'absorbance (310 nm) exprimé en unité d'absorbance par minute.

Pour obtenir l'activité enzymatique de l'échantillon, de simples corrections volumétriques sont nécessaires. L'exemple de l'échantillon dilué par un facteur de 1/2 illustre le procédé à suivre et l'activité LiP (U/L) de l'échantillon original est donc de :

$$\text{LiP} = \frac{\text{Rabs} \times 107,52 \times 1200 \times 10^{-6} \text{ L}}{200 \times 10^{-6} \text{ L}}$$

$$\text{LiP} = \text{Rabs} \times 645$$

D'où la valeur de 645 (rapportée au Tableau 1) par laquelle il faut multiplier le taux d'accroissement de l'absorbance mesuré lors de la réaction enzymatique



### ANNEXE III

#### PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA PEROXIDASE DE MANGANESE

Tirée de (Hodgson, 1998)

En présence de  $H_2O_2$  et de  $MnSO_4$ , la manganèse peroxydase (MnP) s'est avéré avoir la capacité d'oxyder la vanillylacétone Paszczyński, Huynh et Crawford (1987). Cette réaction sert de base à la définition de l'activité enzymatique de la MnP, car par définition, la production de 1  $\mu\text{mol}$  de vanillylacétone peut être catalysée par une 1 unité d'activité (U) par minute à une température de  $30^\circ\text{C}$ . Lors d'un dosage enzymatique MnP, l'échantillon à analyser est mis en présence du substrat (vanillylacétone) et de  $MnSO_4$ . Par la suite, l'ajout de  $H_2O_2$  déclenche la réaction puis le taux initial de formation du produit de réaction est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 334 nm.

Le protocole à suivre est décrit ci-dessous :

Dans des cuvettes en quartz de 1 mL, ajouter les solutions suivantes :

Tampon tartrate pH 5,0	200 $\mu\text{L}$
Échantillon (voir table de dilution)	750 $\mu\text{L}$
$MnSO_4$	20 $\mu\text{L}$
Vanillylacétone	10 $\mu\text{L}$
$H_2O_2^*$	20 $\mu\text{L}$

\*La lecture débute immédiatement après avoir ajouté le  $H_2O_2$ .

Préparation des solutions

Tampon tartrate pH 5 : peser 7,5 g d'acide L-tartrique (150 g/mol) puis compléter à 100 mL avec de l'eau distillée ensuite ajuster le pH à 5,0 avec du NaOH concentré.

Vanillylacétone (M=192) : peser 9,6 mg vanillylacétone puis compléter à 10 mL avec du diméthyl formamide.

MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (M=169) 5 : peser 84,5 g, puis compléter à 100 mL avec de l'eau distillée.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: introduire 93 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % dans un ballon de 50 mL puis compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

### Facteurs multiplicatifs

Les différents facteurs multiplicatifs associés au taux d'accroissement de l'absorbance selon la dilution de l'échantillon sont répertoriés au tableau A2 :

Tableau A2 Facteurs multiplicatifs du calcul de l'activité MnP

Dilution	Volume d'échantillon (µL)	Volume d'eau (µL)	Facteur multiplicatif
1	100	650	-547
1/2	50	700	-1093
1/4	25	725	-2186
1/10	10	740	-5465
1/20	5	745	-10932

### Explication des facteurs multiplicatifs pour le dosage de la MnP

Après avoir introduit le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans l'échantillon à analyser, l'oxydation du vanillylacétone démarre immédiatement si ce dernier possède une activité MnP. Cependant, les valeurs sont négatives car c'est la disparition du vanillylacétone qui est mesurée lors du dosage de la MnP. Comme pour la LiP, le taux de décroissance à 334 nm (unité d'abs/min) est multiplié par le facteur multiplicatif correspondant. Le coefficient d'extinction molaire (em) du vanillylacétone est de 18300 (mol/l)<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>

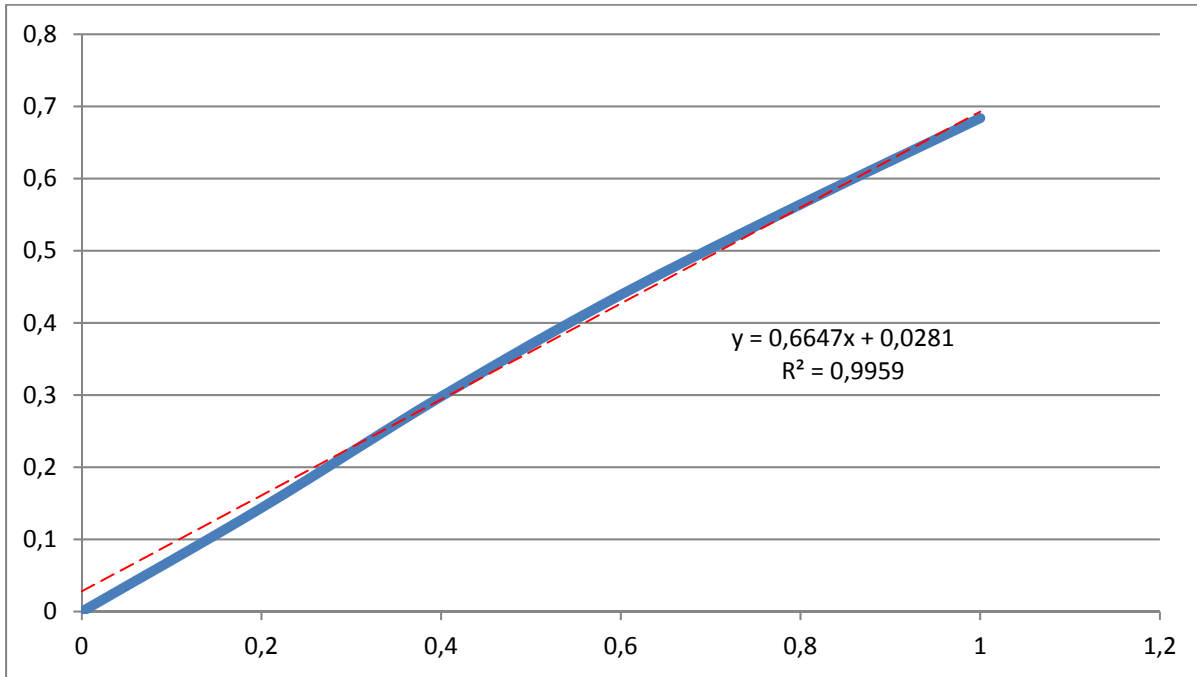
**ANNEXE IV**

**DÉGRADATION DU PAPIER D'ALUMINIUM PAR *P. CHRYSOSPORIUM***



ANNEXE V

COURBE D'ÉTALLONAGE POUR LE TEST DE PHOSPHORE



## LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akamatsu, Y., D.B. Ma, T. Higuchi et M. Shimada. 1990. « A novel enzymatic decarboxylation of oxalic acid by the lignin peroxidase system of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* ». *FEBS Lett.*, vol. 269(1), p. 261-263.
- Alessandro, D'annibale, Stazi Silvia Rita, Vinciguerra Vittorio et Sermanni Gioavvni Giovannozzi. 1999. « Oxirane-immobilized *Lentinula Edodes* Laccase :stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater ». *Journal of Biotechnology*, vol. 34, p. 697-706.
- Asgher, Muhammad, Farina Jamil et Hafiz Muhammad Nasir Iqbal. 2012. « Bioremediation Potential of Mixed White Rot Culture of *Pleurotus Ostreatus* IBL-02 and *Coriolus Versicolor* IBL-04 for Textile Industry Wastewater ». *Bioremediation & Biodegradation*, vol. S1: 007.
- Barclay, C.D. 1991. « An examination of several componets of the biodegrative mechanism of *Phanerochaete chrysosporium* with an emphasis on the transformation of polynuclear aromatic hydrocarbons ». Thèse de doctorat. Université de Waterloo.
- Barr, D.P., M.M Shah, T.A Grover et S.D Aust. 1992. « Production of hydroxyl radical by lignin peroxidase from *phanerochaete chrysosporium* ». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 298, p. 480-485.
- Bonname, P., J. Perez et T.W. Jeffries. 1991. « Regulation of ligninase production in white rot fungi ». In *Enzymes in biomass conversion*. (Washington DC, 30 avril 1991), sous la dir. de Society, American Chemical Vol. 460, p. 200-206.
- Bosco, Francesca, Antonio Capolongo et Bernado Ruggeri. 2010. « Effects of Temperature, pH, Ionic Strength, and Sodium Nitrate on Activity of LiPs: Implications for Bioremediation ». *Bioremediation Journal*, vol. 6:1, p. 65-76.
- Bumpus, J.A., et S.D. Aust. 1987. « Biodegradation of chlorinated organic compounds by *Phanerochaete chrysosporium*, a wood-rotting fungus.ACS Symposium series 338 ». *191st Meeting of the American Chemical Society*, p. 340-349.
- Burdsall, H. 1985. « A contribution to the taxonomy of genus *Phanerochaete* ». *Mycologia Memoir*. 165 p.
- Burdsall, H., et W.E Eslyn. 1974. « A new *phanerochaete* with a *chrysosporium* imperfet state ». *Mycotaxon*, vol. 1, p. 123-133.

- Chaisemartin, David. 2005. « Les 3 grands types d'exploitation des bassins à boues activées ». < <http://www.aquadoc.fr/> [en ligne] consulté Mai 2016 >.
- Chandrashekar, K., P. Arthure Felse et T. Panda. 1999. « Optimization of temperature and initial pH and kinetic analysis of tartaric acid production by *Gluconobacter suboxydans* ». *Bioprocess Engineering*, vol. 20, n° 3, p. 203-207.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Giovannozzi Semanni, G.,. 2000. « Oxirante-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater ». *J. Biotechnol.*, vol. 77, p. 265-273.
- Driss, Loic. 2012. « Transporteurs fongiques de manganèse : diversité et analyse fonctionnelle chez le champignon saprophyte *Phanerochaete chrysosporium* ». Université de Lorraine, 344 p.
- Duran, N., Rosa, M.A, D'Annibale, A., Gianfreda, L.,. 2002. « Application of laccases and tyrosianases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. ». *Enzyme Microb. Technol.* , vol. 31, n° 7, p. 907-931.
- Environnement Canada. 2016. « Les eaux usées ». < <http://www.ec.gc.ca/eau-water> [en ligne] mai 2016 >.
- Faison, B.D, et T.K Kirk. 1985. « Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium* ». *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 49, p. 299-304.
- Fenn, P., et T.K Kirk. 1981. « Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium* ». *Archives of microbiology*, vol. 130, p. 59-65.
- Fernando, T., S.D. Aust et J.A. Bumpus. 1990. « Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium* ». *Environnement Microbiology*, vol. 56(6), p. 1666-1671.
- Forney, L.J., C.A. Reddy, M. Tien et S.D Aust. 1982. « The involvement of hydroxyl radical derived from hydrogen peroxide in lignin degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* ». *Journal of Biol. Chem.*, vol. 257, p. 11455-11462.
- Galhaup, C., H. Wagner, B. Hinterstoisser et D. Haltrich. 2002. « Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *thumetes pubescens* ». *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 30, n° 4, p. 529-536.
- Gao, D.W., L. Du, J. Yang, W. M.Wu et H. Liang. 2010. « A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control ». *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 30(1), p. 70-77.

- Gao, D.W., X.H Wen et Y. Qoam. 2006. « Production of ligninolytic enzymes in bioreactor ». *Huanjing Kexue/Environ. Sci*, vol. 27, p. 333-337.
- Gazette du Canada. 2012. « Règlement sur les effluents des systèmes d'assainissement des eaux usées ». *Gouvernement du Canada*, vol. 146, n° 15.
- Glenn, J.K, I. Akileswaran et M.H Gold. 1986. « Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* ». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 251, p. 688-696.
- Gouvernement du Québec. « Développement durable, Environnement et Lutte contre les changements climatiques ». < <http://www.legisquebec.gouv.qc.ca/fr/ShowDoc> >.
- Hai, Fi, K. Yamamoto et K. Fukushi. 2006. « Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater treatment ». *Desalination*, vol. 192, p. 315-322.
- Hodgson, Pierre Jonathan. 1998. « Étude de la dégradation des acides résiniques par le champignon *phanerochaete chrysosporium* ». Université de Sherbrooke, 145 p.
- INRP. 2005a. « Ammoniac total (NA-16) ». < [http://www.ec.gc.ca/inrp-npri/donnees-data/index.cfm?do=results&process=true&lang=fr&opt\\_report\\_year=2005&opt\\_facility\\_name=&opt\\_npri\\_id=&opt\\_cas\\_name=NA+-16&opt\\_cas\\_num=&opt\\_province=QC&opt\\_postal\\_code=&opt\\_urban\\_center=&opt\\_province\\_comm=&opt\\_naics6=&opt\\_naics3=&opt\\_naics4=&opt\\_nai6code=&opt\\_csic=&opt\\_media=releasesWater&submit=Soumettre](http://www.ec.gc.ca/inrp-npri/donnees-data/index.cfm?do=results&process=true&lang=fr&opt_report_year=2005&opt_facility_name=&opt_npri_id=&opt_cas_name=NA+-16&opt_cas_num=&opt_province=QC&opt_postal_code=&opt_urban_center=&opt_province_comm=&opt_naics6=&opt_naics3=&opt_naics4=&opt_nai6code=&opt_csic=&opt_media=releasesWater&submit=Soumettre) [en ligne] novembre 2016 >.
- INRP. 2005b. « Phosphore total (NA-22) ». < [http://www.ec.gc.ca/inrp-npri/donnees-data/index.cfm?do=results&process=true&lang=fr&opt\\_report\\_year=2005&opt\\_facility\\_name=&opt\\_npri\\_id=&opt\\_cas\\_name=NA+-22&opt\\_cas\\_num=&opt\\_province=QC&opt\\_postal\\_code=&opt\\_urban\\_center=&opt\\_province\\_comm=&opt\\_naics6=&opt\\_naics3=&opt\\_naics4=&opt\\_nai6code=&opt\\_csic=&opt\\_media=releasesWater&submit=Soumettre](http://www.ec.gc.ca/inrp-npri/donnees-data/index.cfm?do=results&process=true&lang=fr&opt_report_year=2005&opt_facility_name=&opt_npri_id=&opt_cas_name=NA+-22&opt_cas_num=&opt_province=QC&opt_postal_code=&opt_urban_center=&opt_province_comm=&opt_naics6=&opt_naics3=&opt_naics4=&opt_nai6code=&opt_csic=&opt_media=releasesWater&submit=Soumettre) [enligne] novembre 2016 >.
- Kaushik, P., et A. Malik. 2010. « Effect of nutritional conditions on dye removal from textile dffluent by *Aspergillus lentulus* ». *World J Microbiol. Biotechnol.*, vol. 26, n° 11, p. 1957-1964.
- Keil, F. 2008. *Les moyens d'intervention pour réduire la pollution de l'eau : principes actifs de médicament pour l'homme*. 60486 Francfort-sur-le-Main, Allemagne.
- Kersten, P., et D. Cullen. 2004. « Enzymology and molecular biology of lignin degradation ». In *The Mycota III : biochemistry and molecular biology*. Vol. 3, p. 249-273.

Kersten, P., et D. Cullen. 2007. « Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* ». *Fungal Genetics and Biology*, vol. 44, p. 77-87.

Kersten, P., M. Tien, B. Kalyanaram et T.K Kirk. 1985. « The ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* generates cation radicals from methoxybenzenes ». *J. Biol. Chem.*

Kirk, T.K, et R.L Farrell. 1987. « Enzymatic "Combustion": the microbial degradation of lignin ». *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 41, p. 465-505.

Veillez sélectionner un type de document autre que « Generic » afin de faire afficher la référence bibliographique.

Kuwahara, M., J.K Glenn, M.A Morgan et M.H Gold. 1984. « Separation and characterization of tzo extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ». *FEBS Lett*, vol. 169(2), p. 247-250.

Leisola, M.S.A., D.C Ulmer et R. Waldner. 1984. « Factors affecting lignin degradation in lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* ». *Archives of microbiology*, vol. 137, p. 171-175.

Lewandowski, G.A, P.M Armenante et D P.A.K. 1990. « Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus ». *Water Research*, vol. 24(1), p. 75-82.

Majeau, Josee-Anne, Satinder K. Brar et Rajeshwar Dayal Tyagi. 2010. « Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants ». *Bioresource Technology*, vol. 101, n° 7, p. 2331-2350.

MDDELCC. 2016a. « 25 ans d'assainissement des eaux usées industrielles au Québec : un bilan (suite) ». < [http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/industrielles/chapitre1\\_b.htm%5B](http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/industrielles/chapitre1_b.htm%5B) enligne] Novembre 2016 >.

MDDELCC. 2016b. « Position ministérielle sur la réduction du phosphore dans les rejets d'eaux usées d'origine domestique ». In *tableau 2 Performances technologiques reconnues avec déphosphatation chimique sur des eaux usées d'origine domestique*. < <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/reduc-phosphore/index.htm-tableau1> [enligne] novembre 2016 >. Consulté le 17 novembre.

MDDELCC. 2016c. « Règlement sur les ouvrages municipaux d'assainissement des eaux usées (Foire aux questions) ». In *question 4. Le règlement québécois est-il harmonisé avec le règlement fédéral?* < <http://www.mddelcc.gouv.qc.ca/eau/eaux-usees/ouvrages-municipaux/reglement-faq.htm> [enligne] novembre 2016 >. Consulté le 17 novembre.



- Ming, Tien, et Kirk Kent. 1988. « Lignin Peroxidase of phanerochaete chrysosporium ». *Academic Press, Inc.*, vol. 161, p. 238-249.
- Palmieri, G., Giardina et P. Sanna, G., . 2005. « Laccase-mediated Remazol brilliant blue R decolorization in fixed-bed bioreactor. ». *Biotechnol. Prog.* 21,, p. 1436-1441.
- Paszczynski, A, V.-B Huynh et R.L. Crawford. 1987. « Comparison of ligninase-I and peroxidase-M2 from the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium ». *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 244, p. 750-765.
- Paszczynski, A., V.-B Huynh et R.L Crawford. 1985. « Enzymatic activities of an extracellular, manganese dependent peroxidase from Phanerochaete chrysosporium ». *FEMS Microbiology Letters*, vol. 29, p. 37-41.
- Pedroza;, Aura M., Rodolfo Mosqueda;, Nicolas Alonso-Vante; et R. Rodriguez-Vasquez. 2006. « Sequential Treatment via Trametes versicolor and UV/TiO<sub>2</sub>/RuxSey to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production ». *Elsevier*, vol. 67, p. 793-801.
- Petit, David. 2012. « Développement d'une nouvelle approche d'enlèvement de l'azote ammoniacal des eaux usées domestiques ». École de technologie supérieure, 125 p.
- Radha, K.V, I. Egupathi, A. Runagiri et T. Urugesan. 2005. « Decolorization studies of synthetic dyes using Phanerochaete chrysosporium and their kinetics ». *Proc. Biochem.*, vol. 40, p. 3337-3345.
- Rodriguez Couto, S. , et J.L.T Herrera. 2006. « Industrial and biotechnological applications of laccases : a review ». *Biotechnology*, vol. 24, n° 5, p. 500-513.
- Rodríguez Couto, S., M. A. Sanromán, D. Hofer et G. M. Gübitz. 2004. « Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus Trametes hirsuta for decolourization of textile dyes ». *Bioresource Technology*, vol. 95, n° 1, p. 67-72.
- Rodriguez Couto, S., et M.A. Sanroman. 2006. « Effect of two wastes from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability ». *J. Food Eng.*, vol. 73, n° 4, p. 388-393.
- Rodriguez-Rincon, F , A Suarez, M Lucas, L Larrondo, T de la Rubia, J Polainna et J Martinez. 2010. « Molecular and structural modeling of the Phanerochaete flavidobrunnea extracellular laccase reveals its ferroxidase structure ». *Archives of microbiology*, vol. 192, p. 883-892.
- Schoemaker, H.E;, et M.S.A Leisola. 1990. « Degradation of lignin by phanerochaete chrysosporium ». *Biotechnology*, vol. 13(2-3), p. 101-109.

- Shim, Soon-Seop, et Katsuya Kawamoto. 2002. « Enzyme production activity of *Phanerochaete chrysosporium* and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor ». *Water Research*, vol. 36, n° 18, p. 4445-4454.
- Singh, Shree N., et Rudra D. Tripathi. 2007. *Environmental Bioremediation Technologies* (2007). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Singh, Shree Nath. 2015. *Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewaters* (2015). Cham: Springer International Publishing : Imprint: Springer, 1 ressource en ligne (XIV, 367 p.) p.
- Swamy, J, et J.A Ramsay. 1999. « Effects of glucose and NH<sub>4</sub>- concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor* ». *Enz Microb. Technol.*, vol. 25, n° 3-5, p. 278-284.
- Thiruchelvam, A.T, et J.A Ramsay. 2007. « Growth and laccase production kinetics of *trametes versicolor* in a stirred tank reactor ». *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 74, p. 547-554.
- Thurston, C.F. 1994. « The structure and function of fungal laccases ». *Microbiology*, vol. 140(1), p. 19-26.
- Vargas, Micaela. 2013. « Elimination des micropolluants dans les eaux usées : étude d'un biofiltre fongique (Fungal Trickling Filter) ». Université de France-Comte, 90 p.
- Vassilev, Nikolay, Antonia R. Requena, Leopoldo M. Nieto, Iana Nikolaeva et Maria Vassileva. 2009. « Production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* grown on medium containing agro-wastes/rock phosphate and biocontrol properties of the final product ». *Industrial crops and products*, vol. 30, n° 1, p. 28-32.
- Ville de Montréal. 2016. *Projet de règlement sur le contrôle des déversements d'eaux usées dans les ouvrages d'assainissement et cours d'eau*.
- Voloshyn, Kostyantyn. 2014. « Problématique de la gestion des eaux usées industrielles au niveau municipal dans les régions de l'Estrie et de la Montérégie ». Université de Sherbrooke, 157 p.
- Wariishi, H., H.B Dumford, I.D MacDonald et M.H Gold. 1989. « Manganese peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Transient state kinetics and reaction mechanism ». *J. Biol. Chem*, vol. 264, p. 3335-3340.

- Xiong, X, X Wen, Y Bai et Y Qian. 2008. « Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* ». *J. Environ Sci (China)*, vol. 20, n° 1, p. 94-100.
- Yang, Fan-Chiang, et Chun-Bun Liao. 1998. « Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* in submerged flask cultures ». In *bioprocess Engineering*. Vol. 19, p. 233-236. 3.