

Réhabilitation de sols industriels contaminés aux hydrocarbures par mycoremédiation

par

Patrick DOSTIE

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

MONTRÉAL, LE 20 JUILLET 2017

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

©Tous droits réservés, Patrick Dostie, 2017

©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 média 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. Frédéric Monette, directeur de mémoire
Génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Robert Hausler, président du jury
Génie de la construction à l'École de technologie supérieure

M. Mathias Glaus, membre du jury
Génie de la construction à l'École de technologie supérieure

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

LE 22 JUIN 2017

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Avant tout, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Frédéric Monette, pour son appui tout au long de ma démarche de maîtrise. La réalisation de la recherche a également été grandement facilitée grâce à l'aide des membres de l'équipe Sanexen Services Environnementaux inc., en particulier MM. Philippe Jobin et Jean-François Larose. L'appui financier par le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG-Subventions d'engagement partenarial) doit être souligné, sans quoi la présente l'étude n'aurait pu être réalisée.

À l'ÉTS, j'aimerais remercier les étudiants, les professeurs et le personnel de la STEPPE pour leur aide tout au long des phases expérimentales en laboratoire. Mathias Plourde a joué un rôle indispensable dans le volet concernant la détection des enzymes. Les ateliers et le service de monitorat soutenus par Mme Christine Richard m'ont également beaucoup aidé durant la rédaction du mémoire. Je tenais à le souligner.

Finalement, l'obtention du diplôme n'aura pas vu le jour sans l'encouragement inconditionnel de Brenda O'Brien, Denis Dostie et Sacha Desjardins.

RÉHABILITATION DE SOLS INDUSTRIELS CONTAMINÉS AUX HYDROCARBURES PAR MYCOREMÉDIATION

Patrick DOSTIE

RÉSUMÉ

Actuellement, 4195 terrains sont contaminés au Québec. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les alcanes (C10-C50) sont présents dans 70 % de ces terrains contaminés. Le Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec (MDDELCC) réglemente les sols contaminés par des niveaux de contamination basés sur la concentration de masse des contaminants. Les mécanismes de transport des contaminants produisent différents types de sols contaminés, dont les sols contaminés de friches industrielles. Ces sols sont caractérisés par des hauts niveaux de contaminants adsorbés dans les micropores du sol. Les technologies de réhabilitation de sols contaminés utilisent des approches chimiques, thermiques, fixatives et biologiques pour éliminer les effets des contaminants sur l'environnement. Les approches biologiques reposent sur le contact entre l'espèce vivante et le contaminant. Les champignons se distinguent d'autres organismes par la sécrétion des enzymes, leur offrant la capacité de s'alimenter dans des environnements inaccessibles à d'autres règnes. Cette étude visait à étudier deux familles d'enzymes générées par des champignons pour la dégradation de deux groupes d'hydrocarbures de sols contaminés : les Laccases, produites par *Pleurotus ostreatus* et qui dégradent les HAP ainsi que les Lipases, produits par *Mucor rouxii*, *Aspergillus versicolor* et *Penicillium simplicissimum*, dégradent les C10-C50. Cette étude explore les capacités de dégradation de ces champignons sur substrats solides homogénéisés dans des sols contaminés. Spécifiquement, les taux de dégradation des hydrocarbures et la détection enzymatique ont été étudiés. Des essais exploratoires ont d'abord permis de valider le potentiel de décontamination présenté dans la littérature et d'étudier les impacts du substrat solide sur la décontamination. *P. ostreatus* est le champignon qui a mené aux meilleurs taux de décontamination (51 % dégradation des HAP et 45 % dégradation des C10-C50). Les essais subséquents de cette étude ont par la suite porter sur les caractéristiques de l'environnement dans laquelle *P. ostreatus* cause la dégradation des hydrocarbures. Ces essais démontrent que la perturbation par homogénéisation réduit la capacité du champignon à dégrader les HAP légers. L'apport d'humidité par vaporisation, l'augmentation du volume de sol, l'augmentation de la concentration des HAP dans le sol brut affectent négativement la dégradation des HAP et des C10-C50. Au total, *P. ostreatus* a permis une dégradation dans 71 % (HAP) et 86 % (C10-C50) des essais après 21 jours. Cette étude démontre pour la première fois que *P. ostreatus* peut dégrader des C10-C50 présents dans des sols contaminés. Les études ultérieures devraient approfondir les connaissances sur les enzymes du champignon, élaborer les mécanismes pour augmenter l'échelle dans laquelle la dégradation peut être obtenue et se concentrer à créer un environnement humide pour la croissance du champignon.

Mots-clés : sols contaminés de friches industrielles, biodégradation, mycoremédiation, *Pleurotus ostreatus*, technologies de réhabilitation de terrains contaminés.

REHABILITATION OF INDUSTRIAL HYDROCARBON CONTAMINATED SOIL BY MYCOREMEDIATION

Patrick DOSTIE

ABSTRACT

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) and alkanes (C10-C50) are common soil contaminants. The Ministry of Sustainable Development, Environment and the Fight Against Climate Change of Quebec determines acceptable levels of soil contamination based on the mass of contaminants in soil and land use. There are currently 4 195 contaminated sites in Quebec. Brownfields are a common type of contaminated site classified by the adsorption of contaminants to the micropores making them unavailable to microorganisms. Different technologies either remove, stabilise or degrade soil contaminants. Certain fungi produce enzymes capable of degrading organic contaminants. Mycoremediation is based on the degradation of the contaminants through direct contact with the enzymes produced by fungi. Laccase, produced by *Pleurotus ostreatus*, degrades PAH. Lipase, produced by *Mucor rouxii*, *Aspergillus versicolor* et *Penicillium simplicissimum*, degrades C10-C50. This study explores the degradative capacity of these solid-state mushrooms homogenised with brownfields contaminated soil. Specifically, degradation rates and the presence of enzymes will be analysed. Initially, *P. ostreatus* obtained the best results, with a maximal degradative capacity of 51 % for PAH and 45 % for C10-C50. Subsequent experiments were done to attempt maximizing this degradative capacity. These studies found that the fungi should not be disturbed once mycoremediation has begun. Disturbances, which include humidifying the surface and homogenisation negatively affect the degradative capacity. Overall, 71 % (PAH) and 86 % (C10-C50) of the trials decreased in contamination after 21 days. This study is the first to demonstrate the role of *P. ostreatus* in the degradation of C10-C50. Future studies should develop fundamental knowledge on the secretion of the enzymes by the mushroom and the limits in industrial-scale mycoremediation.

Keywords: biodegradation, mycoremediation, brownsfield, *Pleurotus ostreatus*, soil rehabilitation technologies.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1.1 Contamination par les HAP et les C10-C50	5
1.1.1 Sources d'HAP et de C10-C50 et impacts sur l'environnement.....	6
1.1.2 Mobilité des contaminants	7
1.1.3 Dispositions réglementaires	9
1.2 Réhabilitation des terrains contaminés	10
1.2.1 Technologies	11
1.2.2 Biodisponibilité des contaminants	12
1.2.3 Mycorémediation	14
1.2.3.1 Biologie des champignons	14
1.2.3.2 <i>Pleurotus ostreatus</i>	15
1.2.3.3 <i>Penicillium simplicissimum</i>	17
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	21
2.1 Maintien et production de culture de champignons.....	21
2.2 Expérimentations	22
2.3 Paramètres analysés	25
2.4 Détection d'enzymes.....	26
CHAPITRE 3 RÉSULTATS	29
3.1 Analyses exploratoires.....	29
3.1.1 Temps de traitement.....	29
3.1.2 Champignons.....	31
3.1.3 Substrats	33
3.2 Essais modifiant un paramètre initial.....	35
3.2.1 Traitement par <i>P. ostreatus</i> à des taux d'ensemencement variables	35
	37
3.2.2 Traitement par <i>P. ostreatus</i> avec différentes teneurs en humidité.....	37
3.2.3 Traitement par <i>P. ostreatus</i> avec vaporisation d'eau à la surface	38
3.2.4 Effet de l'homogénéisation du mélange sol – <i>P. ostreatus</i>	40
3.2.5 Effet de l'échantillonnage de sol brut	42
3.2.6 Effet du volume.....	45
3.2.7 Concentration des HAP.....	48
CHAPITRE 4 DISCUSSION	51
4.1 Pertinence de mycoremédiation.....	51
4.1.1 Détection enzymatique.....	52
4.1.2 Aspect réglementaire.....	53
4.2 Échelle industrielle de mycoremédiation.....	53

	Page
4.2.1 Comparaison de mycoremédiation aux autres technologies	54
CONCLUSION	57
ANNEXE I SITES CONTAMINÉS AU QUÉBEC	59
ANNEXE II TECHNOLOGIES DE RÉHABILITATION DES SOLS CONTAMINÉS	62
LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1	Impact type des hydrocarbures sur la santé des espèces..... 7
Tableau 1.2	Encadrement des terrains contaminés au Canada 9
Tableau 1.3	Niveaux de contamination du MDDELCC 10
Tableau 1.4	Pores du sol selon six catégories..... 13
Tableau 1.5	Différentes stratégies utilisées par les espèces biologiques pour réduire les contaminants organiques dans le sol 14
Tableau 1.6	Taux de réduction des HAP après traitement par <i>P. ostreatus</i> sous différentes conditions d'expérimentation 18
Tableau 2.1	Détails sur les champignons utilisés dans le laboratoire..... 21
Tableau 2.2	Méthodes d'hydratation des substrats solides..... 22
Tableau 2.3	Descriptif des essais..... 24
Tableau 3.1	Contamination C10-C50 après traitement par les substrats..... 34
Tableau 3.2	Changements dans les taux de contamination avant, durant et après traitement 40
Tableau 3.3	Taux de contamination du sol brut en pile..... 42
Tableau 4.1	Échantillons ayant montré une diminution de la concentration de HAP présents dans le sol..... 52

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Portrait de la variation des HAP et C10-C50; (a) acénaphène; (b) phenanthrène; (c) hexabenzocorène; (d) pentadecane 6
Figure 2.1	Représentation du concept final pour transférer l'humidité au sol durant les expériences (a) plan aérien; (b) coupe transversale..... 23
Figure 3.1	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> -1 avec le sol avant traitement..... 30
Figure 3.2	Activité de Laccase dans l'essai <i>P. ostreatus</i> -1 au jour 35 à différentes concentrations de réactifs..... 30
Figure 3.3	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>M. rouxii</i> et <i>A. versicolor</i> avec le sol brut 31
Figure 3.4	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. simplicissimum</i> avec le sol avant traitement 32
Figure 3.5	Activité enzymatique de <i>P. simplicissimum</i> 33
Figure 3.6	Comparaison du taux de contamination de sol traité par le seigle et le tourteau de soja, stérilisé et non stérilisé, avec le sol avant traitement..... 34
Figure 3.7	Croissance observée après 21 jours de traitement pour (a) seigle stérilisé, (b) tourteau de soja stérilisé, (c) seigle non stérilisé et (d) tourteau de soja non stérilisé..... 35
Figure 3.8	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> -1 à différents taux d'ensemencement avec 36
Figure 3.9	Présence de <i>P. ostreatus</i> dans le sol après 21 jours de traitement selon l'ensemencement initial de (a) 2,5 % et (b) 10%..... 36
Figure 3.10	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> avec différentes teneurs en humidité..... 37
Figure 3.11	Traitement par le <i>P. ostreatus</i> -1 après 21 jours sous diverses conditions de croissance à (a) 30 % et (b) 150 % d'humidité 38
Figure 3.12	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> -1 avec vaporisation d'eau à la surface du sol une fois par semaine..... 39

	Page
Figure 3.13	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> -1 avec vaporisation d'eau chargée en mycélium à la surface du sol une fois par semaine 39
Figure 3.14	Comparaison entre la vaporisation d'eau deux fois par semaine (a) avec mycélium et (b) sans mycélium 40
Figure 3.15	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> -1, homogénéisé une fois par semaine 41
Figure 3.16	Traitement par le <i>P. ostreatus</i> après 21 jours, homogénéisé une fois par semaine. 41
Figure 3.17	Taux de dégradation des HAP suite au traitement par le <i>P. ostreatus</i> -2 avec modification de la méthode d'échantillonnage du sol brut..... 43
Figure 3.18	Traitement par <i>P. ostreatus</i> mort après 21 jours 45
Figure 3.19	Détection de Laccase dans les bacs 20 L 46
Figure 3.20	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> -2 mort dans un volume de 20 L 47
Figure 3.21	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> avec pont capillaire dans un volume de 20 L 47
Figure 3.22	Comparaison du taux de contamination de sol traité par <i>P. ostreatus</i> sans aménagement d'un pont capillaire dans un volume de 20 L 48
Figure 3.23	Taux de contamination des HAP dans un sol contaminé > C..... 49
Figure 3.24	Croissance de <i>P. ostreatus</i> observée sous différentes conditions dans un sol fortement contaminé par les HAP (a) <i>P. ostreatus</i> -1 à 10 %, (b) Mort, (c) <i>P. ostreatus</i> -2 à 33 % et (d) <i>P. ostreatus</i> -1 à 33 %..... 50
Figure 3.25	Détection de Laccase dans un sol contaminé > C par les HAP 50

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

#-HAP	Nombre (#) de noyaux benzéniques du HAP
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
CEAEQ	Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
C10-C50	Alcanes avec 10 à 50 atomes de carbone
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
EP	Enzymes protéinés
MDDELCC	Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques
n/a	non applicable
pNPP	4-nitrophénylphosphate
SC	Sol contaminé

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

H _S	Taux d'humidité du sol souhaité (%)
H _A	Taux d'humidité du sol actuel (%)
M _H	Masse du sol séché (g)
mg/kg sol	milligramme de contaminant par kilogramme de sol
mM	micromole
nm	nanomètre
pH	potentiel hydrogène
rpm	révolutions par minute

INTRODUCTION

Les sols contaminés constituent un problème observé partout au monde. Les contaminants peuvent avoir un impact sur la santé humaine et celle des écosystèmes. Les contaminants sont groupés par leur composition moléculaire; organique ou inorganique. Les hydrocarbures sont des contaminants organiques ayant une composition moléculaire exclusivement de carbone et d'hydrogène. Les HAP et les C10-C50 sont des hydrocarbures. Les hydrocarbures sont des contaminants de sol communs, car ils sont associés à des activités pétrolières courantes.

Au Canada, les chercheurs estiment qu'entre 20 000 et 30 000 terrains seraient contaminés et que 60 % des sites sont contaminés par des hydrocarbures (Gomez et Sartaj, 2014; Sousa, 2001). Au Québec, en 2016, il avait 4195 terrains contaminés portés à l'attention du Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MDDELCC) (Annexe I). Au total, 70 % des terrains contaminés sont contaminés par les contaminants organiques.

Il existe des procédés thermiques, chimiques, fixatifs et biologiques pour éliminer la contamination par les HAP et les C10-C50. Certains procédés biologiques utilisent des microorganismes pour traiter biologiquement les sols. Les enzymes des microorganismes transforment les contaminants en molécules moins nocifs (Peixoto, Vermelho, et Rosado, 2011). La dégradation des HAP par les bactéries nécessite plusieurs enzymes et le type de bactéries capable de dégrader les HAP lourds (plus que trois noyaux benzéniques) est limité (Johnsen, Wick, et Harms, 2005). Les bactéries *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteobacteria spp.* et *Gordonia spp.* dégradent les C10-C50 par la production des enzymes non-hème di-fer monooxygénase, alkane hydroxylase et cytochrome P450 alkane hydroxylase (Bak, Bonnicksen, Jørgensen, Nicolaisen, et Nybroe, 2015; Matsui *et al.*, 2014). Les C10-C50 lourds (C20 et plus) prennent davantage de temps pour être dégradés (Liu, Xu, Liang, et Liu, 2014).

La mycoremédiation est un procédé biologique qui se concentre sur la production des enzymes par des champignons pour transformer les contaminants. Le champignon *Pleurotus ostreatus* est souvent cité dans la littérature à ce sujet. *P. ostreatus* a pu par exemple dégrader les HAP de 2 à 6 noyaux benzéniques en milieu in vitro (culture de champignon mis en contact avec contaminant pur) et en milieu in vivo (culture de champignon mis en contact avec sol contaminé) (Adebayo-Tayo, Jonathan, Popoola, et Egbomuche, 2011; Bhatt, Cajthaml, et Šašek, 2002). Il est accepté que l'enzyme Laccase dégrade les HAP (Válková, Novotný, Malachová, Šlosarčíková, et Fojtík, 2017). L'enzyme Lipase dégrade les C10-C50. La dégradation des C10-C50 par le champignon *Penicillium simplicissimum* est démontrée (Boekema *et al.*, 2007; Margesin, 2014; Park *et al.*, 2015). Yamada-Onodera, Mukumoto, Katsuyama, et Tani (2002) ont obtenu une dégradation jusqu'à 65 % des C20 et plus en 21 jours en milieu in vivo.

Au Québec, l'industrie de réhabilitation de sol utilise fréquemment des procédés biologiques pour dégrader les HAP et C10-C50. Les contaminants lourds posent des problèmes particuliers, car leur dégradation par les bactéries est lente. La mycoremédiation est limitée par la compréhension des mécanismes biologiques du champignon et la considération des modalités pratiques de l'industrie de réhabilitation. La présente étude vise à déterminer le changement dans les taux de contamination d'un sol industriel de friche contaminé attribuable au traitement par champignon (mycoremédiation). Le changement dans le taux des hydrocarbures HAP et C10-C50 déterminera la capacité de dégradation du champignon. L'étude établit les premières bases techniques permettant d'utiliser des champignons pour dégrader ce type de contaminants organiques présents dans les sols.

Le rapport se divise en cinq chapitres principaux. Le premier chapitre présente une synthèse de la littérature en lien avec la dégradation des C10-C50 et HAP de sols contaminés. Le second chapitre détaille le matériel utilisé ainsi que les méthodes suivies lors des différentes expérimentations menées en laboratoire. Le troisième chapitre présente les résultats découlant des différents essais réalisés. Le quatrième chapitre discute des perspectives d'utilisation d'une

approche de mycoremédiation pour la réhabilitation de sols industriels contaminés. Une conclusion complète finalement le document.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Les sols contaminés sont présents partout dans le monde et nuit la santé humaine et de l'environnement. Les gouvernements encadrent les sols contaminés pour limiter leurs effets négatifs. Au Québec, le MDDELCC détermine les seuils de contamination acceptables selon la concentration des contaminants et l'utilisation du terrain. Les hydrocarbures sont les contaminants de sol les plus fréquents au Québec. Pour traiter cet enjeu de société, l'industrie de réhabilitation des sols contaminés utilise différentes technologies (thermiques, chimiques, fixatifs et biologiques). L'enlèvement des HAP lourds nécessite davantage d'énergie ou de temps. Le cycle de vie du champignon, peu ou pas utilisé par l'industrie de réhabilitation, augmente le contact entre les enzymes et les contaminants de sol.

1.1 Contamination par les HAP et les C10-C50

Le terme hydrocarbure englobe toutes les molécules composées exclusivement de carbone et hydrogène (le méthane, les hydrocarbures saturés et insaturés ainsi que les hydrocarbures aromatiques). Les différentes familles d'hydrocarbures se distinguent au point de vue moléculaire (Figure 1.1). Les HAP constituent une fraction des hydrocarbures aromatiques composés de noyaux benzéniques fusionnés. Les C10-C50 représentent une fraction de la famille d'hydrocarbures saturés qui possède entre 10 et 50 atomes de carbone.

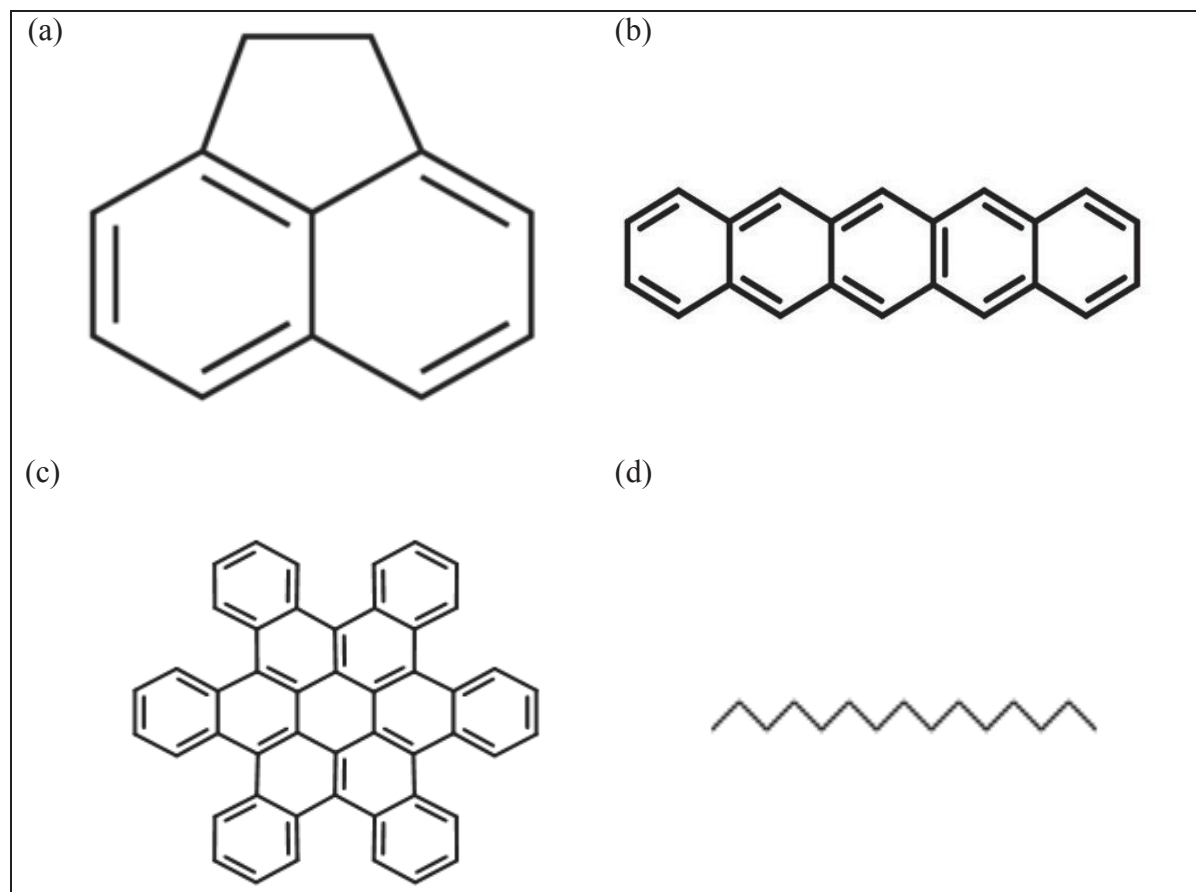


Figure 1.1 Portrait de la variation des HAP et C10-C50; (a) acénaphtène; (b) phenanthrène; (c) hexabenzocorène; (d) pentadecane

1.1.1 Sources d'HAP et de C10-C50 et impacts sur l'environnement

Les hydrocarbures proviennent d'activités naturelles ou anthropiques. Les activités naturelles sont indépendantes de l'activité humaine, c'est-à-dire l'activité volcanique ou un feu de forêt (Morelli, Nazareno Saparrat, Del Panno, Coppotelli, et Arrambari, 2013). Les hydrocarbures provenant d'activités anthropiques sont liés à différentes industries, telles que l'industrie pétrolière, le transport, la cokéfaction de charbon et la fonte d'aluminium (Biache, Mansuy-Huault, et Faure, 2014; Pichtel, 2016). Peu importe la provenance des hydrocarbures, la mobilité des contaminants fait en sorte que ceux-ci peuvent rejoindre la nappe phréatique et se dissoudre dans l'eau souterraine.

L'effet des hydrocarbures sur le vivant dépend de l'espèce. Pour certaines espèces, les hydrocarbures ont des effets toxiques, et pour d'autres, ils apportent une source d'énergie (Tableau 1.1). La présence d'une plante peut également favoriser la croissance des microorganismes qui dégradent les hydrocarbures (Bell *et al.*, 2014). Cependant, les contaminants réduisent les fonctions écosystémiques et la durabilité de l'écosystème (Wagg, Bender, Widmer, et van der Heijden, 2014).

Tableau 1.1 Impact type des hydrocarbures sur la santé des espèces

Espèce affectée	Effets négatifs	Effets positifs
Microorganisme	Réduction de l'activité enzymatique et de la biomasse (Alrumman, Standing, et Paton, 2015)	Croissance (Alrumman <i>et al.</i> , 2015)
Plante	Réduction de la biomasse jusqu'à mort (Lin <i>et al.</i> , 2016)	Croissance (Oliveira <i>et al.</i> , 2014)
Animal	Nuit le développement des organes et promu le cancer (Asghar <i>et al.</i> , 2016; Tomy <i>et al.</i> , 2014)	n/a

1.1.2 Mobilité des contaminants

La mobilité des contaminants à travers un sol contaminé dépend sur les mécanismes de mobilité des contaminants. Selon van der Perk (2006), les mécanismes de mobilité sont : la provenance du contaminant, le vecteur d'introduction du contaminant, les propriétés physicochimiques du contaminant et le temps. Le profil de contamination de sol est dynamique, c'est-à-dire que les contaminants sont constamment à risque de mouvement. Toutefois, lorsque les contaminants sont adsorbés dans les micropores du sol, leur mobilité diminue.

Les contaminants entrent dans un sol par un vecteur d'introduction direct ou indirect (van der Perk, 2006). Un vecteur d'introduction direct est traçable à un endroit précis, c'est-à-dire une perforation dans un réservoir de mazout, une conduite, etc. Un vecteur d'introduction indirect

n'est pas traçable à un endroit précis, c'est-à-dire la déposition atmosphérique, le ruissellement, etc. (Chen, Mulder, Wang, Zhao, et Xiang, 2004).

Le temps affecte le mouvement des contaminants dans le sol. La mobilité des contaminants dans le sol diminue avec le temps (Duan, Naidu, Liu, *et al.*, 2015; Jodeh *et al.*, 2014; Reid, Jones, et Semple, 2000). Par exemple, l'adsorption ou l'absorption des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par la matière organique du sol ou dans les pores du sol diminue leur biodisponibilité (Duan, Naidu, Thavamani, Meaklim, et Megharaj, 2015); (Kwon, Lee, Hwang, Lee, et Yang, 2016). Les HAP volatiles ont tendance à se volatiliser, comparées aux HAP semi-volatiles ou non volatiles qui s'adsorbent au sol (Thavamani *et al.*, 2015).

Les propriétés physicochimiques des hydrocarbures affectent le mouvement des contaminants au sol. La mobilité et la concentration des contaminants déterminent le profil de contamination. Les propriétés physicochimiques sont uniques à chaque contaminant. Dans certaines conditions, les contaminants peuvent migrer dans la nappe phréatique, où ils peuvent affecter la qualité de l'eau souterraine. Anderson et Laberge (2003) listent les propriétés ayant une haute importance sur le mouvement des contaminants : la solubilité, la miscibilité, le coefficient de partition, la masse volumique, la volatilité et la constante de la Loi de Henry.

Les propriétés physicochimiques affectent la solubilité des molécules. La solubilité des contaminants organiques dans l'eau indique la capacité de l'eau à transporter les contaminants dans l'environnement. La miscibilité des contaminants est comme la solubilité, mais pour des liquides. En d'autres mots, les liquides sont tous miscibles et solubles, mais les solides sont seulement solubles. Le coefficient de partition détermine la tendance à la séparation du contaminant entre la phase organique (sol, microorganisme, etc.) et la phase aqueuse (Anderson et Laberge, 2003). La phase pure des contaminants plus lourds que l'eau (c'est-à-dire ayant une plus grande masse volumique que l'eau) descend sous la nappe phréatique. La phase pure des contaminants moins lourds que l'eau flotte au-dessus la nappe.

Les contaminants volatiles sont capables de se transformer de la phase liquide ou solide à la phase gazeuse. La Loi de Henry détermine quant à elle la quantité de contaminants passant de la phase liquide à l'atmosphère.

1.1.3 Dispositions réglementaires

La réglementation des sols contaminés existe dans plusieurs pays, dont le Canada. Chaque province et territoire a développé un protocole à suivre quant à la contamination des sols (Tableau 1.2). Les réglementations au Canada diffèrent notamment dans la catégorisation des vocations de terrains. Par exemple, cinq vocations de terrains sont utilisées en Alberta : naturelle, agricole, résidentiel, commerciale et industriel (Parks, 2016).

Tableau 1.2 Encadrement des terrains contaminés au Canada

Lieu de juridiction	Protocole
Alberta	<i>Contaminated Sites Policy Framework</i>
Canada (couronne)	Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement du CCME
Colombie-Britannique	<i>Contaminated Sites Regulation</i>
Ile-du-Prince-Édouard	<i>Petroleum Hydrocarbon Remediation Regulations</i>
Manitoba	<i>Contaminated Sites Remediation Act</i>
Nouveau-Brunswick	<i>Guideline for the Management of Contaminated Sites</i>
Nouvelle-Écosse	Contaminated Sites Regulations
Nunavut	<i>Environmental Guideline for the Management of Contaminated Sites</i>
Ontario	<i>Records of Site Condition</i>
Québec	Règlement sur la protection et la réhabilitation des terrains
Saskatchewan	<i>Saskatchewan Environmental Code: Impacted sites</i>
Terre-Neuve et Labrador	<i>Guidance Document for the Management of Impacted Sites</i>
Territoires du Nord-Ouest	<i>Environmental Guideline for Contaminated Site Remediation</i>
Yukon	<i>Contaminated Sites Regulations</i>

Au Québec, un sol est considéré contaminé en fonction des seuils de contamination. En 1998, le MDDELCC a établi six seuils de contamination (Tableau 1.3). La concentration de contaminant permise dépend de l'usage du terrain. Le niveau de contamination permis sur un terrain à vocation industriel est plus élevé qu'un terrain à vocation résidentiel. La liste du ministère offre un portrait des seuils (Annexe I).

Tableau 1.3 Niveaux de contamination du MDDELCC

Niveau de contamination	Description
> A	Aucune trace du contaminant.
A	Limite détectable par les méthodes d'analyses. Aucune concentration de contaminant ne sera trouvée par les méthodes d'analyses.
A-B	Un terrain contaminé au niveau A-B peut être utilisé par les usages spécifiés par B et C.
B	Limite réglementaire pour les terrains résidentiels, récréatifs, institutionnels et commerciaux situés dans un secteur résidentiel.
B-C	Un terrain contaminé au niveau B-C peut être utilisé par les usages spécifiés par C.
C	Limite pour les terrains à vocation commerciale et industrielle.
D	Aucun usage permis.

Un répertoire des terrains contaminés est rendu public sur le site web du MDDELCC. Ce répertoire présente les données nécessaires pour créer un portrait de la problématique par région administrative du Québec (Annexe I). En date du 11 novembre 2016, 4195 terrains contaminés étaient connus du ministère. Parmi ces terrains, 70 % sont contaminés par des HAP ou des C10-C50.

1.2 Réhabilitation des terrains contaminés

Il existe au moins 22 technologies pour réhabiliter un terrain contaminé. Les technologies utilisent des approches différentes pour réduire les impacts sur la santé humaine et celle des écosystèmes. Le contrôle sur les conditions environnementales (c'est-à-dire la température, la

mobilité des intrants, les nutriments, etc.) est essentiel au succès du projet de réhabilitation. Les connaissances sur les conditions environnementales nécessaires à la mycoremédiation seront élaborées dans cette section.

1.2.1 Technologies

Toute une gamme de technologies existe pour réhabiliter un terrain contaminé. Le choix d'un traitement dépend, entre autres, des facteurs économiques et géographiques. Les traitements peuvent détruire les contaminants ou les rendre immobiles (Annexe II). Parfois, un prétraitement est utilisé pour réduire le volume de sol à traiter. D'abord, les techniques de traitement sont séparées en prétraitement, destruction de contaminant et immobilisation.

Les prétraitements et les traitements peuvent se faire avec ou sans excavation du sol. Les traitements *in situ* n'utilisent pas l'excavation pour faire un traitement ou un prétraitement. Généralement, des forages sont utilisés pour injecter ou aspirer un liquide ou un gaz pour promouvoir la dégradation des contaminants ou pour transformer la phase des contaminants. Les traitements *ex situ* nécessitent l'excavation du sol. Les prétraitements ou traitements qui suivent l'excavation peuvent se faire sur site ou hors site.

Prétraitement

Les prétraitements visent à concentrer les contaminants. Le prétraitement peut maintenir ou changer la forme (solide, liquide, gaz) sous laquelle le contaminant se trouve. Généralement, les prétraitements réduisent les contaminants en une seule phase. Ils permettent à l'industrie de concentrer leurs efforts en réduisant leurs coûts. Les prétraitements requièrent de l'énergie constante pour être réalisés.

Techniques d'immobilisation

Une technologie d'immobilisation cherche à empêcher l'interaction entre l'environnement et les contaminants. Ces technologies ne tentent pas d'abaisser le taux de contamination, mais plutôt de diminuer les dangers sur la santé de l'environnement par l'immobilisation des

contaminants. La stabilisation des contaminants à un endroit prédéterminé vise un environnement sans effets toxiques. Les techniques d'immobilisation utilisent de l'énergie ou utilisent une parcelle de terrain. Les technologies d'immobilisation n'éliminent pas la présence des contaminants dans l'environnement. Elles permettent de limiter l'exposition des contaminants à l'environnement.

Techniques destructives

L'aspect commun des technologies d'élimination est la transformation des contaminants en des substances moins nocives ou inoffensives, parfois jusqu'à la minéralisation. Chaque technologie d'élimination stimule des réactions d'oxydoréduction. Les technologies d'élimination utilisent des méthodes thermiques, chimiques ou biologiques pour stimuler les réactions. Les techniques destructives passives prennent beaucoup de temps. Les techniques actives nécessitent de l'énergie constante.

Les technologies d'élimination biologiques reposent sur la mise en culture d'organismes capables de réduire la contamination. Certaines plantes et microorganismes peuvent éliminer les contaminants du sol. Les conditions de mise en culture des organismes sont essentielles au succès du traitement. Or, la biodisponibilité des contaminants est aussi importante lorsqu'une technologie d'élimination biologique est appréhendée.

1.2.2 Biodisponibilité des contaminants

La biodisponibilité est définie comme la fraction de contaminant librement capable d'entrer dans la membrane cellulaire de l'organisme à un moment précis (Riding, Doick, Martin, Jones, et Semple, 2013). Une faible biodisponibilité suggère qu'un traitement par une technologie d'élimination biologique nécessitera un traitement préalable pour réussir (Rein *et al.*, 2016). La porosité du sol et les caractéristiques biologiques de l'espèce utilisée affectent la biodisponibilité des contaminants.

La porosité du sol

Il existe différentes catégories de pores, tels que présentés au Tableau 1.4 (Lu, Malik, Chen, et Wu, 2014). Les contaminants diffus dans les pores inférieurs à 30 μm sont généralement considérés comme immobiles (van der Perk, 2006). Dans un sol, l'activité microbienne se limite aux pores avec un diamètre supérieur à 0,2 μm , sachant que les contaminants peuvent également se diffuser dans des pores de diamètre inférieur (Cébron *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

Tableau 1.4 Pores du sol selon six catégories

Nom	Volume du pore (μm)
Macropore	> 75
Mesopore	30 - 75
Micropore	5 - 30
Ultramicropore	0,1 - 5
Cryptopores	< 0,1

Les espèces biologiques

Les espèces biologiques capables d'éliminer les contaminants utilisent différentes stratégies pour le faire (Tableau 1.5). Les technologies d'élimination biologiques reposent sur la dégradation des contaminants par une espèce. L'une des stratégies utilisées par l'espèce est la sécrétion d'enzymes dans l'environnement.

Tableau 1.5 Différentes stratégies utilisées par les espèces biologiques pour réduire les contaminants organiques dans le sol

Catégorie	Stratégie de réhabilitation
Plantes	Translocation vers la plante (Hernández-Vega <i>et al.</i> , 2017)
Bactéries	L'enzyme intégrée dans la membrane de la bactérie dégrade les contaminants (Liu <i>et al.</i> , 2017)
Champignons	L'enzyme sécrétée dégrade les contaminants (Treuet Falandysz, 2017)

1.2.3 Mycorémediation

La mycoremédiation est une forme de technologie d'élimination biologique; elle permet la sécrétion d'enzymes par un champignon dans le but de réduire le taux de contaminants organiques du sol. Pour réussir la mycorémediation, il est essentiel de maximiser les conditions de croissance du champignon afin de produire suffisamment les enzymes ciblées (Johnsen, Wick, et Harms, 2005).

1.2.3.1 Biologie des champignons

Les champignons sont un règne qui comprend les organismes unicellulaires (levures) et pluricellulaires (moisissures et champignons avec corps de fructification). Les champignons pluricellulaires sont composés d'hyphes, un filament de cellules distinct séparé par le septum. Alors que la croissance de nouvelles cellules et d'hyphes se fait exclusivement à l'apex (l'extrémité), les hyphes peuvent se connecter partout (Lejeune et Baron, 1997). La connection de deux hyphes permet l'échange d'informations génétiques et chemine vers la production de spores. Dans le cas des champignons avec un corps de fructifications, ces hyphes dicaryotiques développent le corps de fructification qui émet les spores dans l'environnement par les branchies.

Les enzymes catalysent les réactions d'oxydoréduction. Les réactions catalysées assurent le fonctionnement du métabolisme du champignon. Les enzymes sont produites à l'intérieur de la cellule par diverses combinaisons d'organelles. Les vestibules transportent les enzymes partout à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.

La piste classique de sécrétion enzymatique est bien documentée dans la littérature (Prada, Furlan, Matteoli, et Verderio, 2013). Les organelles, respectivement le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, synthétisent et plient la protéine enzymatique. Giraldo *et al.* (2013) ont identifié des enzymes générées par le champignon sans l'appareil de Golgi, ce qui indique la possibilité d'autres pistes pour produire l'enzyme.

Une fois synthétisés, trois mécanismes existent pour transporter les enzymes hors de la membrane plasmique. Les vestibules s'intègrent aux membranes plasmiques par pression (1) ou à l'aide des enzymes déjà intégrées dans la membrane plasmique (2) (Brown, Wolf, Prados-Rosales, et Casadevall, 2015). Les vestibules peuvent également passer à travers la membrane plasmique par le cytosquelette (3) (Brown *et al.*, 2015). Une fois présents dans l'environnement extracellulaire, les enzymes interagissent avec leur environnement, offrant la possibilité de catalyser des réactions génétiquement prédéterminées. Les enzymes peuvent rester dans l'environnement extracellulaire ou peuvent être perdues à l'environnement (Wingender, Neu, et Flemming, 2012).

1.2.3.2 *Pleurotus ostreatus*

Commun et comestible, le *Pleurotus ostreatus* est un champignon de la division Basidiomycota. Dans la nature, *P. ostreatus* jouent un rôle dans la dégradation de la lignine et dans le recyclage des nutriments.

Les conditions environnementales affectent la croissance de *P. ostreatus*. Les hyphes de *P. ostreatus* croît entre un pH de 5 et 9, avec le taux maximal entre 6 et 7 (Hou, Zhou, Wang, Du, et Yan, 2004). *P. ostreatus* croît entre 4 et 35°C, avec taux maximal entre 25 et

30°C (Adebayo-Tayo *et al.*, 2011; Anderson, 2016; Sardar, Ali, Ayyub, et Ahmed, 2016; Zadražil, 1975). *P. ostreatus* nécessite un environnement humide; le champignon croît avec un taux d'humidité entre 60 et 90 %, avec un taux optimal entre 70 et 80 % (Aggelis *et al.*, 2003; Asghar, Tariq, et Rehman, 2007; Ashraf, Ali, Ahmad, Ayyub, et Shafi, 2013; McCracken, 1972).

Le *Pleurotus ostreatus* sécrète trois groupes d'enzymes d'oxydoréduction pour dégrader la lignine. Les Peroxidases de lignine et les Peroxidases-manganèse utilisent le peroxyde (H_2O_2) comme oxydant et les Laccases utilisent l'oxygène (O_2) (Jayasinghe, Hettiaratchi, Mehrotra, et Kumar, 2014; Lalaoui, Elouarzaki, Le Goff, Holzinger, et Cosnier, 2013). Les Laccases sont des enzymes non spécifiques, permettant l'oxydation de nombreuses molécules, telles que les HAP (Andersson et Henrysson, 1996; Jones et Solomon, 2015). Les HAP suivants ont été oxydés par la Laccase : naphthalène, phénanthrène, fluorène et fluoranthène (Chang, Lee, Liu, Liao, et Yang, 2016; Pozdnyakova *et al.*, 2016). La Laccase oxyde les HAP en HAP-quinone. Subséquemment, la Laccase divise les noyaux benzéniques des HAP-quinones et d'autres enzymes les minéralisent (Pozdnyakova *et al.*, 2016).

La production de Laccase par *P. ostreatus* varie avec la souche choisie et la phase de croissance. Sous les mêmes conditions, deux souches de *P. ostreatus* peuvent avoir une différence d'un facteur de six dans la production de Laccase (Membrillo, Sánchez, Meneses, Favela, et Loera, 2008). La production de Laccase se concentre dans les phases d'expansion, d'activation du métabolisme de base et d'autolyse (Lettera, Del Vecchio, Piscitelli, et Sannia, 2011).

Les conditions environnementales affectent l'activité de Laccase. La Laccase est active entre un pH de 3,5 et 8,5, avec une activité maximale entre 4,5 et 7,0 (Díaz *et al.*, 2013; Kumari et Negi, 2014; Mansur, Arias, Copa-Patiño, Flärdh, et González, 2003). La Laccase est active entre 4 et 75°C, avec une activité élevée entre 25 et 75°C (Hu, Wang, Wang, Zhang, et Chen, 2014; Mukhopadhyay, Dasgupta, et Chakrabarti, 2015).

Plusieurs études confirment la métabolisation des HAP par *P. ostreatus* (Tableau 1.6). Ces études ont observé la dégradation de 14 HAP différents par *P. ostreatus*. Le champignon sous forme liquide et sur substrat solide a été utilisé durant ces essais. L'utilisation de champignon sous forme liquide a toujours été jumelée avec l'ajout de contaminant direct dans la solution. Le champignon sur substrat solide a été combiné avec trois types de sols contaminés : sol stérilisé dopé de HAP; sol non stérilisé dopé de HAP; sol non stérilisé contaminé par des HAP. Ces études (Tableau 1.6) montrent une grande différence de résultats. En effet, pour un même contaminant, sous des conditions comparables, le taux de dégradation variait jusqu'à 71 %. Ces différences peuvent être attribuées aux concentrations du contaminant utilisé, aux combinaisons de contaminants, ainsi que les différences de souches de champignons employées.

1.2.3.3 *Penicillium simplicissimum*

Le *Penicillium simplicissimum* est un champignon commun de la division Ascomycota. Ce champignon dégrade la végétation. Ce champignon se trouve naturellement dans les sols (Haas *et al.*, 2016). Le *P. simplicissimum* sécrète une grande quantité de Lipase (Ramos-Sánchez, Cujilema-Quitio, Julian-Ricardo, Cordova, et Fickers, 2015; Silva, Godoy, Gutarra, et Freire, 2014). La présence de C10-C50 favorise la production de Lipase (Boekema *et al.*, 2007; Breuil, Shindler, Sijher, et Kushner, 1978; Kanwar, Gogoi, et Goswami, 2002). Cette enzyme hydrolyse les liens C-C des gras, des huiles, des triglycérides et des C10-C50 (Boekema *et al.*, 2007; Margesin, 2014; Park *et al.*, 2015).

Plusieurs études démontrent la métabolisation des C10-C50 par Lipase, mais peu d'études se sont intéressées à la métabolisation des C10-C50 par *P. simplicissimum*. Les études sur la production enzymatique de *P. simplicissimum* démontrent qu'il produit beaucoup de Lipase (Duarte, Silva, Freire, Cammarota, et Gutarra, 2015; Gutarra, Godoy, Castilho, et Freire, 2007; Salihu, Alam, AbdulKarim, et Salleh, 2012). Deux autres champignons reconnus pour leur production de Lipase ont été étudiés, soit le *Mucor rouxii* et le *Aspergillus versicolor*.

Tableau 1.6 Taux de réduction des HAP après traitement par *P. ostreatus* sous différentes conditions d'expérimentation

Nombre de noyaux benzéniques	Nom du contaminant	Contaminant ajouté à la culture de <i>P. ostreatus</i>	Contaminant et <i>P. ostreatus</i> ajouté au sol stérilisé	Contaminant et <i>P. ostreatus</i> ajouté au sol non stérilisé	<i>P. ostreatus</i> ajouté au sol contaminé non stérilisé
2	Acénaphthylène	n/a	77 ^h	n/a	n/a
2	Naphtylène	n/a	98 ^p	n/a	n/a
2	Fluorène	96 ^a , 65 ^b , 42 ⁿ , 76 ^c	98 ^l	n/a	26 ^f , 35 ^f , 92 ^g
3	Anthracène	74 ^a , 92 ^b	84 ⁱ , 95 ^j	99 ^k	19 ^f , 53 ^f , 89 ^g
3	Fluoranthène	95 ^b , 27 ⁿ , 44 ^c	n/a	n/a	29 ^f , 31 ^f , 51 ^g
3	Phénanthrène	90 ^b , 88 ^c , 93 ^d	53 ⁱ , 71 ^l	n/a	0 ^f , 20 ^f , 91 ^g
4	Benzo (a) anthracène	n/a	73 ^l	92 ^k	n/a
4	Benzo (j) fluoranthène	n/a	n/a	n/a	21 ^g
4	Benzo (c) phénanthrène	n/a	n/a	n/a	0 ^f , 13 ^f , 35 ^g
4	Méthyl-3 cholanthrène	n/a	n/a	n/a	0 ^f , 42 ^f , 12 ^g
4	Chrysène	n/a	n/a	n/a	27 ^g
4	Pyrène	91 ^a , 92 ^b , 20 ^c	99 ⁱ , 97 ^h , 62 ^l	n/a	22 ^f , 42 ^f , 48 ^g
5	Benzo (a) pyrène	50 ^e , 65 ^o	78 ^h	n/a	54 ^g
5	Dibenzo (a,h) anthracène	n/a	n/a	31 ^k	54 ^g
6	Dibenzo (a,l) pyrène	n/a	n/a	n/a	40 ^g

n/a contaminant non présent dans l'étude;

a 21 jours (Adebayo-Tayo *et al.*, 2011; Bezalel, Hadar, Fu, Freeman, et Cerniglia, 1996);

b 48 jours (Schutzendubel, Majcherczyk, Johannes, et Huttermann, 1999);

c 60 jours (Sacket Günther, 1993);

d 11 jours (Bezalel, Hadar, Fu, Freeman, et Cerniglia, 1996);

e 15 jours (Rodriguez, Nuero, Guillen, Martinez, et Martinez, 2004);

f 98 jours (Bhatt *et al.*, 2002);

g 60 jours (Covino *et al.*, 2010);

h 15 jours (Rocha, Pinto, Ferreira, da Silva, et Oliveira, 2014);

i 56 jours (Novotny *et al.*, 1999);

j 56 jours (Novotny *et al.*, 2004);

k 65 jours (Andersson et Henrysson, 1996);

l 84 jours (Anderson et Laberge, 2003);

m 60 jours (Ipeaiyeda, Nwauzor, et Akporido, 2015);

n 14 jours (Pozdnyakova *et al.*, 2016);

o 30 jours (Bhattacharya, Das, Prashanthi, Palaniswamy, et Angayarkanni, 2014);

p 22 jours (Sukor, Yin, Savory, et Abdul-Talib, 2012).

Certains chercheurs ont étudié la croissance du champignon dans le but de production de laccase et de mieux comprendre le rôle de cette enzyme dans l'hydrolyse. Ces études trouvent que les hyphes de *P. simplicissimum* s'étendent entre les pH 2 et 11, avec le taux maximal entre les pH 3 et 7 (Bakatula *et al.*, 2015; Rasoulnia, Mousavi, Rastegar, et Azargoshasb, 2016). Les études réalisées sur *P. simplicissimum* ont été menées à la température de pièce (Liu *et al.*, 2012; Silva, Godoy, Gutarra, et Freire, 2014; Yuan *et al.*, 2013). Les études sur le taux d'humidité de *P. simplicissimum* relèvent par ailleurs une préférence pour un taux d'humidité se situant entre 70 et 95 % (di Luccio *et al.*, 2004; Godoy, Gutarra, Castro, Machado, et Freire, 2011).

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Maintien et production de culture de champignons

Les cultures pures de champignons ont été obtenues de différentes sources tel qu'indiqué au Tableau 2.1. Afin de produire une quantité suffisante pour les expériences, les cultures pures ont été reproduites grâce à des ensemencements sur plaques d'Agar 100 mm x 15 mm. Un échantillon d'environ 5 mm de diamètre des champignons purs sur Agar a ainsi été disposé sur une plaque vierge d'Agar de dextrose de pomme de terre (Fisher Scientific). Les plaques d'Agar ont été laissées à la température de la pièce ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) dans le noir durant 15 jours. La culture de *P. ostreatus* (alimentaire) n'était pas reproduite (des nouvelles cultures ont été commandées au besoin). Les cultures ont ensuite été maintenues à 5°C jusqu'à leur utilisation.

Tableau 2.1 Détails sur les champignons utilisés dans le laboratoire

Abréviation	Nom scientifique	Source	Type de culture
<i>A. versicolor</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> 9314	UAMH Centre for Global Microfungal Biodiversity	Agar
<i>M. rouxii</i>	<i>Mucor rouxii</i> 8113		
<i>P. simplicissimum</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i> 5946		
<i>P. ostreatus</i> -1	<i>Pleurotus ostreatus</i> 7964		
<i>P. ostreatus</i> -2	<i>Pleurotus ostreatus</i> (alimentaire)	Mycoboutique Inc.	En solution

Production de culture sur substrat solide

Avant colonisation par les champignons, les substrats solides (grain de seigle et tourteau de soja; source : Shur-Gain Gérard Maheu Inc.) ont été hydratés et stérilisés. L'hydratation a été réalisée selon la procédure spécifiée au Tableau 2.2. Le substrat humidifié a été placé dans un contenant de verre de 1 L dont le couvercle métallique a été perforé par un trou de 1 cm de diamètre, puis bouché par du coton. Du papier d'aluminium a été placé par-dessus le couvercle,

puis le contenant (et son contenu) a ensuite été stérilisé à l'autoclave pendant 25 minutes à 121°C et 103 kPa. Une fois le contenu refroidi à la température de la pièce, sous une hotte, trois échantillons de champignons de diamètre d'environ 5 mm ont été ajoutés au contenant. Dans le cas de la culture liquide, 10 mL de champignon a été ajouté. Les contenants ont ensuite été stockés dans le noir à 25°C. Le contenu a été homogénéisé une fois que le champignon a couvert 25 % du substrat. Le contenu a ensuite été laissé au repos au noir jusqu'à temps que le champignon colonise complètement le substrat, soit environ 10-15 jours. Les contenants ayant de la contamination visible par un (des) autre(s) champignon(s) que celui ciblé ont été rejetés.

Tableau 2.2 Méthodes d'hydratation des substrats solides

Substrat	Champignon	Procédure d'humidification du substrat
Grain de seigle	<i>P. ostreatus</i> -1 <i>P. ostreatus</i> -2	Trempe dans l'eau pendant 16 heures, puis rinçage et égouttement
Tourteau de soja	<i>P. simplicissimum</i> <i>M. rouxii</i> <i>A. versicolor</i>	Homogénéisation de 0,55 kg d'eau avec 1 kg de tourteau

2.2 Expérimentations

Le sol contaminé de friche industrielle (source confidentielle) a été tamisé pour retirer les particules de sol avec un diamètre supérieur à 1 cm. Les sols ont été mélangés à la main jusqu'à pleine homogénéisation. Trois échantillons ont ensuite été prélevés pour les fins d'analyses de HAP et de C10-C50. L'eau ajoutée avant l'essai a été homogénéisée au sol selon l'équation (2.1). Le taux d'humidité souhaité a été fixé à 30 %, suite aux observations en laboratoire démontrant une amélioration de la croissance du champignon (données non présentées).

$$\text{Eau ajoutée (g)} = H_S \cdot M_H \cdot (1 - H_A) - H_A \cdot M_H \quad (2.1)$$

Où :

H_S : Taux d'humidité du sol souhaité (%)

M_H : Masse du sol (g)

H_A : Taux d'humidité du sol actuel (%)

Les sols humidifiés mis à l'essai ont été homogénéisés avec le substratensemencé de champignon pendant 60 secondes avant le démarrage des essais. En absence de référence dans la littérature, le ratio volumique sol : substrat a été fixé préliminairement à 2 : 1. Un volume de sol et de champignon de 3 L a alors été placé sur une géomembrane plane et trouée tendue à 5 cm du haut d'un bac en plastique de 10 L avec couvercle et côtés perforés. Le bac contenait 2 L d'eau distillée au fond reliée au sol par une géomembrane en coton servant de pont capillaire (Figure 2.1).

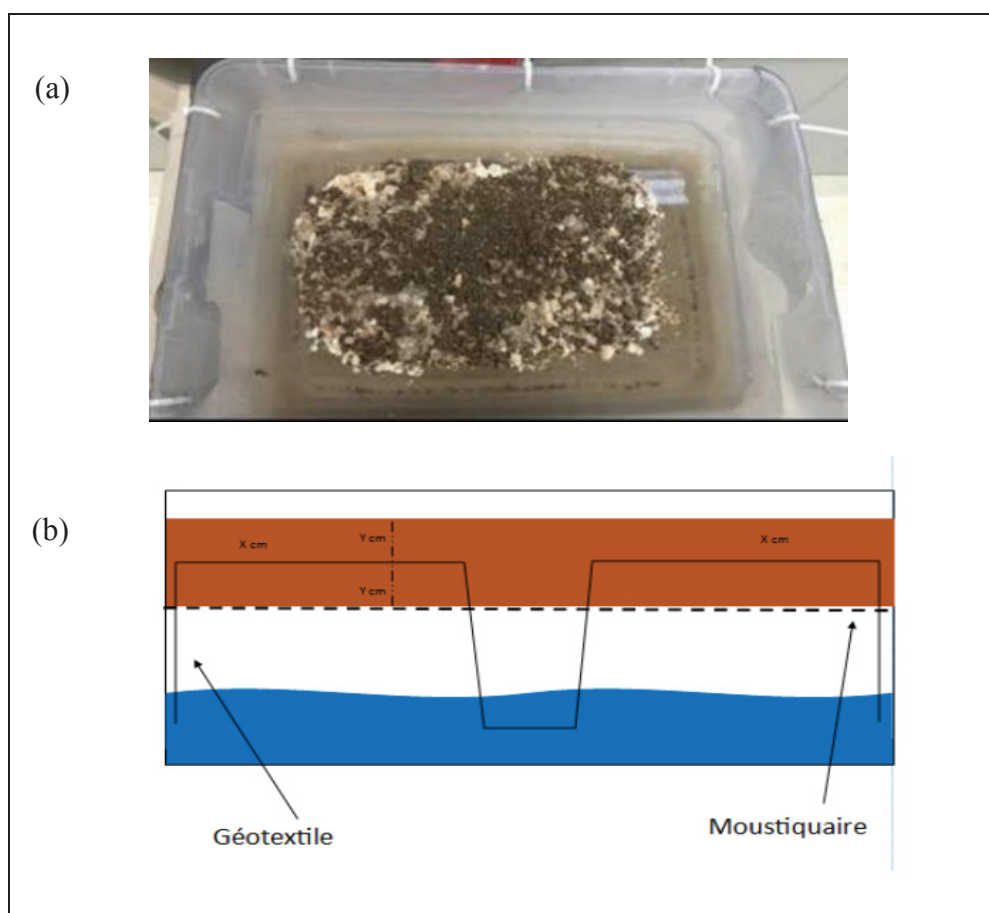


Figure 2.1 Représentation du concept final pour transférer l'humidité au sol durant les expériences (a) plan aérien; (b) coupe transversale

Le maintien du taux d'humidité dans les bacs de 3 L a été réalisé suivant le concept présenté à la Figure 2.1. Le fond du bac est rempli d'eau et perforé pour laisser passer l'air. Une géomembrane transfère l'eau du fond du bac au sol via l'action capillaire d'un pont. La géomembrane a été centrée dans la masse de sol et passe à travers à deux reprises longitudinalement. Un géotextile perforé retient suspendu le mélange sol-champignon au-dessus l'eau.

Au cours des essais, certains paramètres ont été modifiés. Les modifications ont respecté les protocoles suivants. L'homogénéisation de l'essai a été faite une fois par semaine pendant 60 secondes. L'humidification a été faite deux fois par semaine à l'aide d'un vaporisateur pendant 30 secondes à un mètre au-dessus du bac d'essai. Des expériences avec des volumes de mélange de 20 L ont aussi été réalisées dans des bacs de 80 L avec insufflation d'air humidifié à travers le sol selon un débit de 10 mL/s. Le sommaire des essais réalisés est présenté au tableau 2.3.

Tableau 2.3 Descriptif des essais

Phase d'expérimentation	Effet étudié	Condition particulière	Analyses
Exploratoire	Temps	<i>P. ostreatus</i> -1 pendant 21 jours	HAP, C10-C50
		<i>P. ostreatus</i> -1 pendant 35 jours	HAP, C10-C50 Laccase
	Souche de champignon	<i>M. rouxii</i>	HAP, C10-C50
		<i>A. versicolor</i>	
		<i>M. rouxii</i> <i>A. versicolor</i>	
		<i>P. simplicissimum</i>	HAP, C10-C50 Laccase, Lipase
	Substrats	Tourteau de soja non stérilisé	HAP, C10-C50
		Grains de seigle non stérilisé	
	Substrats stérilisé	Tourteau de soja stérilisé	
		Grains de seigle stérilisé	

Tableau 2.3 Descriptif des essais (suite)

Phase d'expérimentation	Effet étudié	Substrat utilisé	Analyses
Modification	Concentration	<i>P. ostreatus</i> -1 taux d'ensemencement varié entre 1 et 10 %	HAP, C10-C50
	Humidité	<i>P. ostreatus</i> -1 Ajustement du taux d'humidité du sol à 30 % ou 150 %	
		<i>P. ostreatus</i> -1 Vaporisation de surface	
	Échantillonnage de sol brut	<i>P. ostreatus</i> -1 à 10 %	
		<i>P. ostreatus</i> -1 mort	
		<i>P. ostreatus</i> -2 à 33 %	
		Sans traitement avec l'ajout d'eau	
	Apport de champignon	<i>P. ostreatus</i> -1 homogénéisé et humidifié par vaporisation de surface	
	Volume de l'essai	<i>P. ostreatus</i> -2 mort	HAP, C10-C50 Laccase
		<i>P. ostreatus</i> -2 avec pont capillaire	
		<i>P. ostreatus</i> -2 sans pont capillaire	
	Concentration des HAP	<i>P. ostreatus</i> -2	
		<i>P. ostreatus</i> -1	
		<i>P. ostreatus</i> -1 à 10 %	
		Sans traitement	

2.3 Paramètres analysés

Suite au traitement du sol par le champignon (plusieurs semaines), environ 100 mL de sol a été prélevé, puis envoyé au *Laboratoire Maxxam* pour la détermination des teneurs résiduelles en HAP, en C10-C50 et en eau. La teneur en eau ainsi que le pH du sol ont également été réalisés en laboratoire. Le Tableau 2.4 détaille les méthodes employées dans pour chacun des paramètres analysés.

Tableau 2.4 Paramètres analysés

Paramètre	Méthode	Matériel
HAP	MA. 400 – HAP 1.1	Laboratoire Maxxam
C10-C50	MA. 400 – HYD 1.1	Laboratoire Maxxam
Teneur en eau du sol	ASTM D-2216	Étuve Coupelle d'aluminium Balance
pH de sol	WD-35610	Vérification de sol
Taux d'humidité après échantillonnage	MA. 400 – HAP 1.1 MA. 400 – HYD 1.1	Laboratoire Maxxam

2.4 Détection d'enzymes

Afin de confirmer la présence ou non d'enzymes produites par les champignons à l'essai lors des expériences, des analyses des enzymes Laccase et Lipase ont été réalisées. Les méthodes de détection des enzymes sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

Laccase

La méthode de détection du Laccase a été développée en accord avec celle indiquée par Irshad, Asgher, Sheikh, et Nawaz (2011). Un échantillon de 50 mL de culture solide et 100 mL de tampon malonate pH 4,5 (Fisher Scientific) est agité pendant 30 minutes à 150 rpm dans une fiole Erlenmeyer. L'échantillon est ensuite filtré à travers un papier Whatman No. 1 qui est rincé par 5 mL de tampon malonate. Le liquide filtré est ensuite refiltré une deuxième fois. Le liquide est ensuite centrifugé à 3 000 g à 25°C pour 5 minutes.

Dans une cuvette, 1 mL de 50 mM de tampon malonate buffer pH 4,5, 1 mL de 1 mM ABTS (Fisher Scientific) et 0,1 mL de liquide centrifugé sont ajoutés. La cuvette est agitée pour en homogénéiser le contenu, puis elle est immédiatement placée dans le spectromètre (Hach DR 2700) et l'absorbance à 420 nm est mesurée. L'absorbance est notée à chaque 10 minutes (ou moins) jusqu'à stabilisation. Un blanc (sans liquide centrifugé) est utilisé pour calibrer le spectromètre avant son utilisation.

Lipase

La méthode de détection du Lipase a été développée en accord avec celle indiquée par Glogauer *et al.* (2011). Un échantillon de 50 mL de culture solide, 1 % Triton X100 (Fisher Scientific) et 1 % tampon phosphate (Fisher Scientific) 20 mM pH 8 sont agités pendant 60 minutes à 200 rpm dans une fiole Erlenmeyer. Le mélange contenant l'échantillon est ensuite filtré à travers un papier Whatman No. 1 qui est rincé par 5 mL de tampon phosphate. Le liquide filtré est ensuite refiltré une deuxième fois. Le liquide est ensuite centrifugé à 10 000 rpm à 25°C pour 10 minutes.

Par la suite, 0,15 mL du liquide centrifugé, 0,9 mL de Tris-HCl (Fisher Scientific) 50 mM pH 8,0 contenant 0.4 % Triton X100 (Fisher scientific) et 0,1 mL pNPP solution (Fisher Scientific) 16,5 mM dans 2-propanol (Fisher Scientific) sont ajoutés à la cuvette. La cuvette est agitée pour en homogénéiser le tou, puis elle est immédiatement placée dans le spectromètre et l'absorbance à 420 nm est mesurée. L'absorbance est notée à chaque 10 minutes (ou moins) jusqu'à stabilisation. Un blanc (sans liquide centrifugé) est utilisé pour calibrer le spectromètre avant son utilisation.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Des essais exploratoires ont d'abord été réalisés pour déterminer quels champignons parviennent à réduire la concentration des contaminants. D'autres analyses exploratoires ont été effectuées pour étudier la durée de traitement pour dégrader les contaminants. Ensuite, les expériences subséquentes ont permis d'étudier les différentes variables relatives à la mise en œuvre d'une décontamination d'un sol par les champignons (mycoremédiation).

3.1 Analyses exploratoires

Des essais exploratoires ont été réalisés dans la perspective d'utiliser des champignons dans un contexte de mycoremédiation. Seulement les traitements effectués avec le *P. ostreatus* ont permis une baisse de la contamination pour tous les noyaux benzéniques. Les autres traitements ont démontré un impact moins significatif.

3.1.1 Temps de traitement

P. ostreatus

Les 2-HAP, 3-HAP et 4-HAP ont obtenus les meilleurs taux d'enlèvement, soit entre 40,0 et 68,2 %. Les taux d'enlèvement des 5-HAP et 6-HAP varient entre 33,3 et 50 %; soit des valeurs plus basses, mais des taux jugés tout de même significatifs. Les C10-C50, avec un taux initial de 4900 mg/kg sol, ont vu une dégradation de 46,9 % (jour 21) et 44,9 % (jour 35). Ces résultats montrent que la dégradation des HAP légers comme lourds peuvent être dégradés, ainsi que la capacité du *P. ostreatus* à dégrader les C10-C50. Les taux d'enlèvement semblent moins affectés par le temps, car les HAP diffèrent entre 0,0 et 12,5 %. Un temps de traitement de 21 et 35 jours semble suffisant pour réduire la concentration des HAP de plus de 50 % (Figure 3.1).

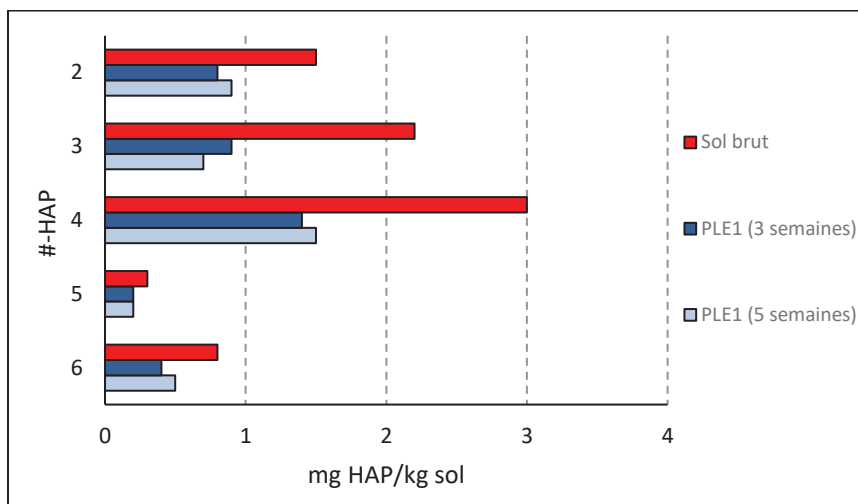


Figure 3.1 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus-1* avec le sol avant traitement

L'enzyme Laccase a été détectée dans l'échantillon de sol (Figure 3.2). La métabolisation d'ABTS par le Laccase augmente l'absorbance jusqu'au moment de saturation du substrat (ABTS) ou à la désactivation du Laccase. Le plateau de la courbe explique ce phénomène. À 10 mM ABTS, la courbe n'a pas atteint de plateau, ce qui indique que cette concentration est trop élevée pour atteindre le point de saturation/dénaturation.

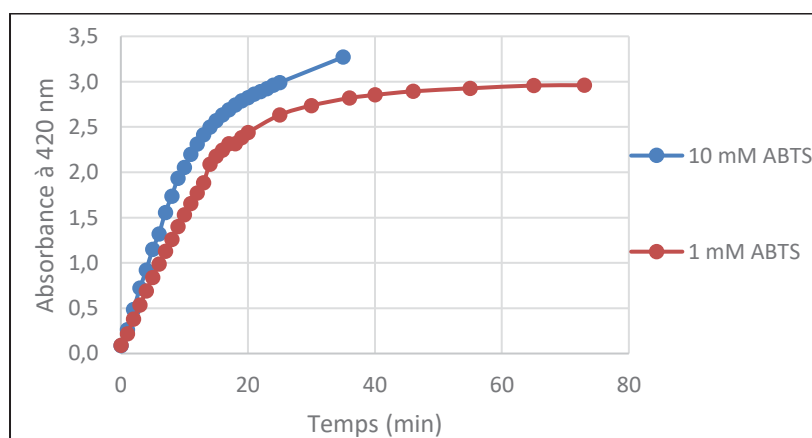


Figure 3.2 Activité de Laccase dans l'essai *P. ostreatus-1* au jour 35 à différentes concentrations de réactifs

3.1.2 Champignons

M. rouxii et *A. versicolor*

Le traitement par *M. rouxii* et *A. versicolor* ensemble a vu une baisse du taux de contamination des HAP initiaux de 7,8 à 5,5 mg/kg sol, soit 30,5 % (Figure 3.3). En particulier, ce traitement a permis une baisse de 20 % (2-HAP) à 40,9 % (3-HAP) des noyaux benzéniques. Le traitement de ces champignons séparés a mené à une augmentation du taux de contamination par les HAP, soit de 10,3 % (*A. versicolor*) et 70,5 % (*M. rouxii*). Cette augmentation de la concentration totale de contaminants est largement liée aux 2-HAP (*A. versicolor*; *M. rouxii*), 4-HAP (*M. rouxii*) et 5-HAP (*M. rouxii*). Quant aux C10-C50, seulement le traitement par *M. rouxii* et *A. versicolor* ensemble a causé une baisse (12,2 %) du taux initial (4 900 mg/kg sol). Les traitements séparés par *A. versicolor* et *M. rouxii* ont vu une augmentation de 30 % (*M. rouxii*) et de 8,2 % (*A. versicolor*). Ces résultats démontrent un léger potentiel pour le traitement par *M. rouxii* et *A. versicolor* de réduire les taux de contamination des HAP et des C10-C50, uniquement lorsque les deux champignons sont utilisés ensemble. Le traitement par *A. versicolor* et *M. rouxii*, ensemble ou séparément, n'a pas eu d'impact sur le taux de contamination des C10-C50, le contaminant pour lequel ces champignons ont été sollicités.

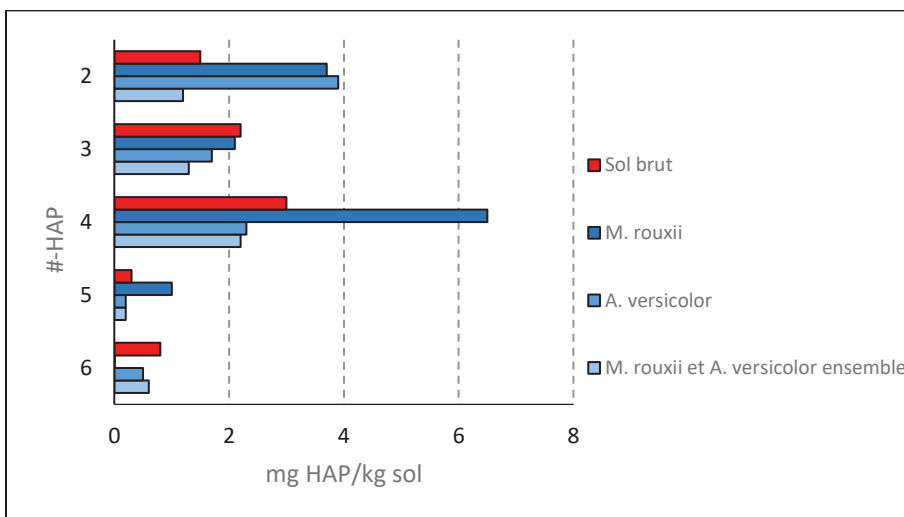


Figure 3.3 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *M. rouxii* et *A. versicolor* avec le sol brut

P. simplicissimum

P. simplicissimum ne semble pas apte au traitement des HAP, ni des C10-C50 dans un sol contaminé de friches industrielles. Quant aux HAP, les 3-HAP ont observé une baisse de 16,7 %, mais les autres groupes ont vu une augmentation de 6,3 % (2-HAP) à 37,5 % (6-HAP) (Figure 3.4). Le traitement par *P. simplicissimum* n'a permis aucun changement dans la concentration de C10-C50; les taux de contamination avant et après traitement des C10-C50 sont demeurés à 3300 mg/kg sol.

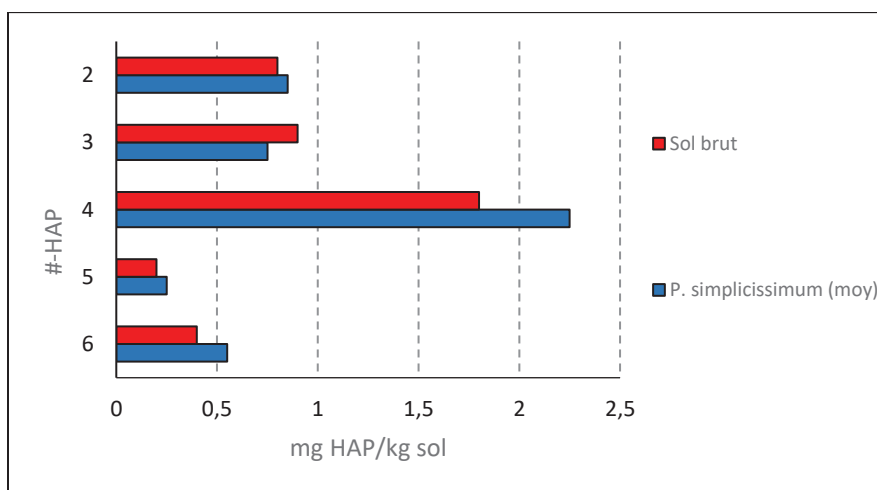


Figure 3.4 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. simplicissimum* avec le sol avant traitement

Des analyses enzymatiques ont été réalisées lors des essais réalisés avec le *P. simplicissimum* (Figure 3.5). Aucun Laccase a été détecté, ce qui concorde avec le profil de détection enzymatique du champignon. Le Lipase a été détecté par l'activation de pNPP dans la culture. La courbe montre une concentration élevée de pNPP dans l'échantillon, causant une augmentation continue dans le temps.

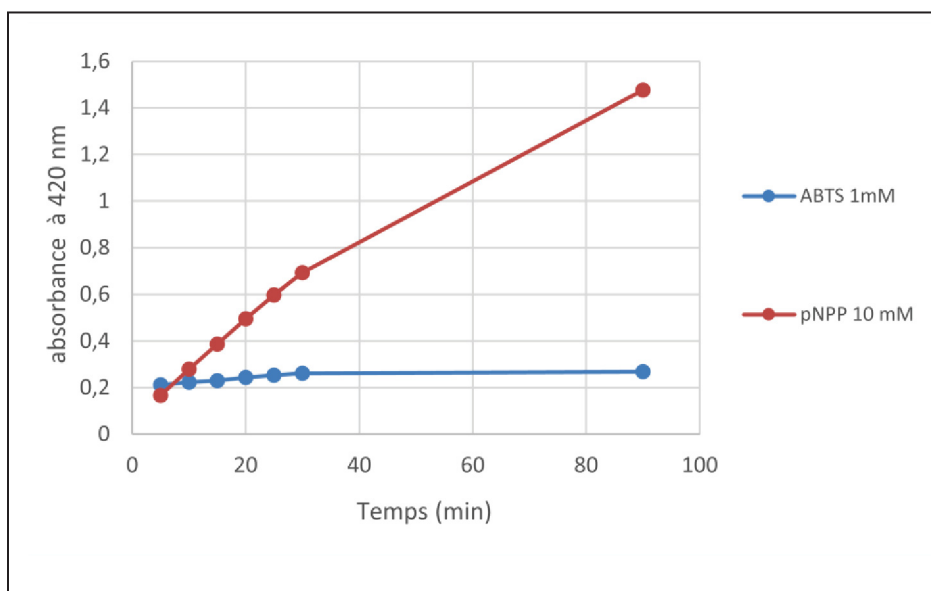


Figure 3.5 Activité enzymatique de *P. simplicissimum*

3.1.3 Substrats

L'action de stérilisation présente un impact sur le taux de contamination par les HAP (Figure 3.6). Les essais menés avec le seigle et le tourteau de soya stérilisés ont vu des augmentations respectives de 7,3 et de 78,0 % des HAP. Les essais non stérilisés ont permis une baisse de 17,1 % (seigle) et de 51,2 % (tourteau de soya stérilisé) des HAP. Quant aux C10-C50, le seigle stérilisé est le seul substrat n'ayant pas permis d'abaisser la concentration (Tableau 3.1). Ces essais ont déterminé que le seigle stérilisé n'a pas d'impact sur les C10-C50 et il augmente légèrement les 2 et 3-HAP. Les substrats stérilisés qui sont utilisés comme supports solides des champignons ne semblent pas provoquer la dégradation des HAP, ni des teneurs en C10-C50 observées dans les autres expériences.

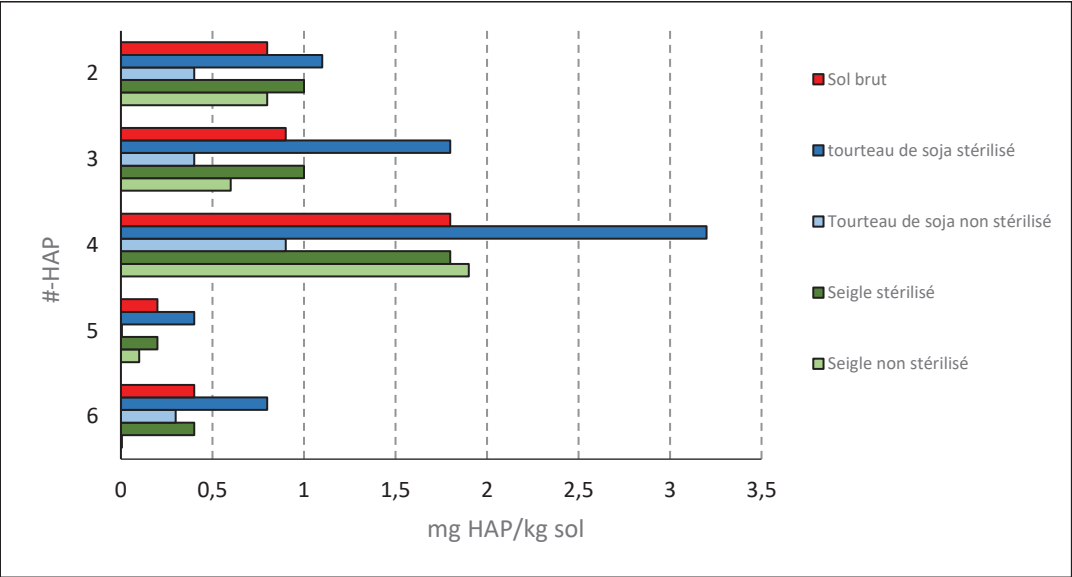


Figure 3.6 Comparaison du taux de contamination de sol traité par le seigle et le tourteau de soja, stérilisé et non stérilisé, avec le sol avant traitement

Tableau 3.1 Contamination C10-C50 après traitement par les substrats

Traitement	Taux de contamination C10-C50 (mg/kg sol)
Avant traitement	3 300
Tourteau de soja stérilisé	3 100
Tourteau de soja non stérilisé	1 900
Seigle stérilisé	3 300
Seigle non stérilisé	2 800

Les champignons ont montré une croissance lors de tous les traitements, sauf l’essai réalisé avec le seigle non stérilisé (Figure 3.7). Ces champignons proviennent soit du sol, soit de l’air ou encore du substrat (dans le cas du substrat non stérilisé).

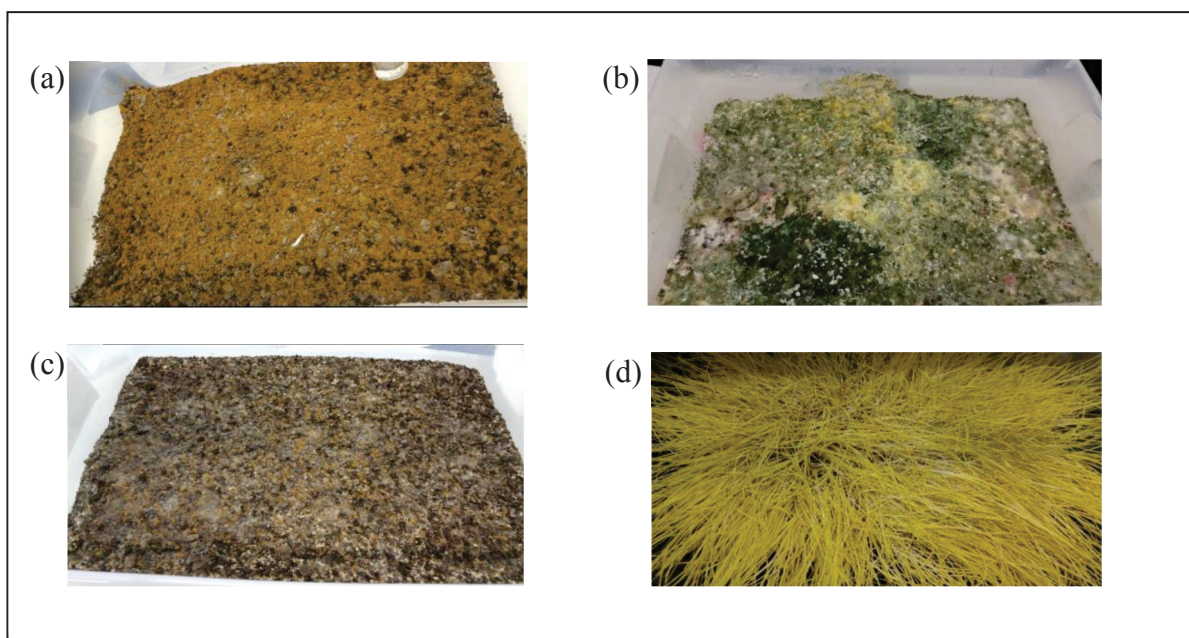


Figure 3.7 Croissance observée après 21 jours de traitement pour (a) seigle stérilisé, (b) tourteau de soja stérilisé, (c) seigle non stérilisé et (d) tourteau de soja non stérilisé

3.2 Essais modifiant un paramètre initial

Ces essais ont permis d'approfondir les connaissances sur la croissance de champignon dans un sol et les facteurs d'influence. Les facteurs tels que le volume de sol utilisé et le taux d'humidité peuvent avoir un impact sur la densité des hyphes au sol.

3.2.1 Traitement par *P. ostreatus* à des taux d'ensemencement variables

La contamination en HAP a diminué de 18 mg/kg (sol brut) à près de 5 mg/kg sol pour les taux d'ensemencement en *P. ostreatus* allant de 1,0 à 5,0 %, soit près de 72 % d'enlèvement (Figure 3.8). Le taux d'ensemencement de 10 % a quant à lui conduit à un enlèvement moindre des HAP, avec une valeur résiduelle de 8 mg/kg de sol, soit 56 % d'enlèvement. Les taux d'ensemencement testés (1,0 à 10,0 %) ont conduit à des valeurs résiduelles en C10-C50 variant de 4100 à 4900 mg/kg de sol traité (sol initial à 8 500 mg/kg sol), soit des enlèvements allant de 42 à 52 %. Ces résultats montrent le potentiel du champignon *P. ostreatus* à traiter

les HAP et les C10-50, et ce, même à de faibles taux d'ensemencement du champignon dans le sol. Visuellement, les essais avec de faibles taux d'ensemencement en *P. ostreatus* voient une croissance moins étendue que celles avec des taux plus élevés (Figure 3.9), mais cela ne semble pas en affecter les rendements. Les taux de contamination par C10-C50 ont baissé de 46,9 % (jour 21) et de 44,9 % (jour 35) par rapport à la concentration avant traitement (4900 mg/kg sol).

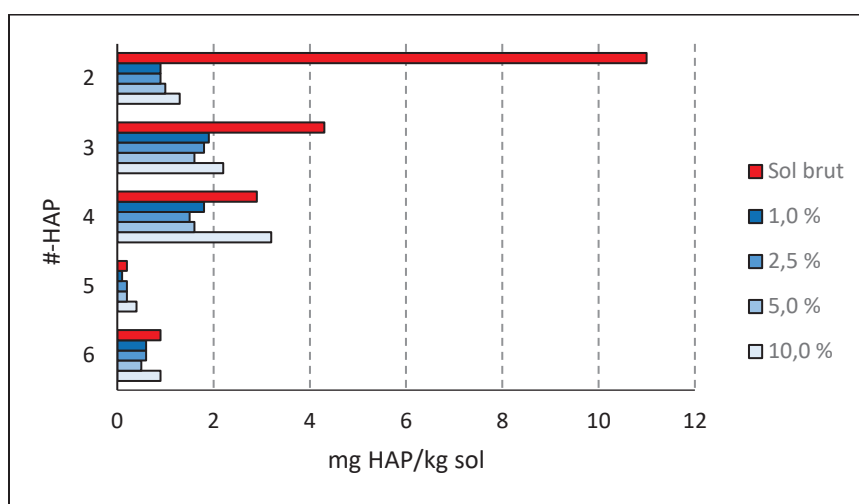


Figure 3.8 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus*-1 à différents taux d'ensemencement avec le sol avant traitement

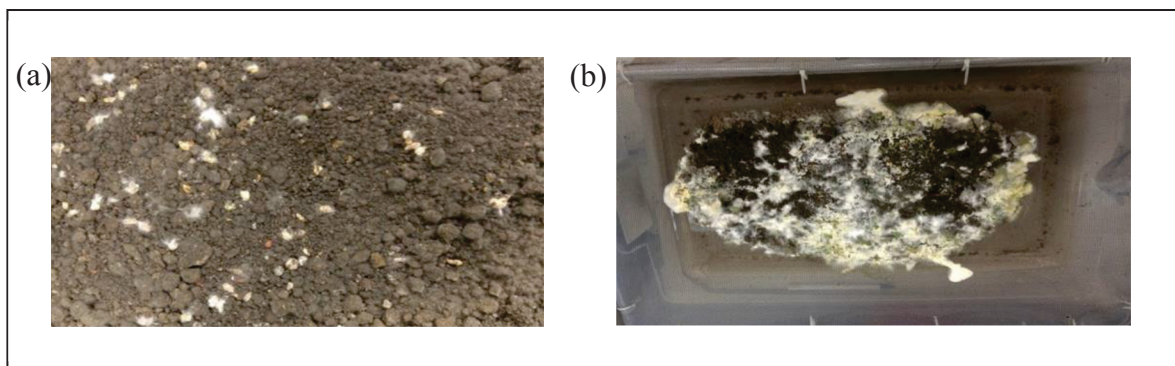


Figure 3.9 Présence de *P. ostreatus* dans le sol après 21 jours de traitement selon l'ensemencement initial de (a) 2,5 % et (b) 10%

3.2.2 Traitement par *P. ostreatus* avec différentes teneurs en humidité

Le traitement par *P. ostreatus* avec différentes teneurs en humidité a permis un enlèvement des 6-HAP (Figure 3.10). Les 2-HAP ont été moins affectés avec un taux de changement de $-6,3$ ou $+12,5$ %. Malgré le traitement obtenu avec le *P. ostreatus*-1 humidifié à 150 % avec une baisse des 6-HAP, le champignon n'a pas été observé dans le sol (Figure 3.11). La teneur en humidité de 150 % a empêché la colonisation du champignon. Ceci indique que le champignon peut dégrader efficacement les contaminants même s'il n'est pas visible à l'œil nu.

Globalement, la teneur en humidité de 30 % a permis une baisse de 34 % des HAP. Quant aux C10-C50, l'ajout d'eau (humidité) au sol a contribué à une baisse dans les taux de C10-C50 de 26,6 % pour une teneur en humidité de 150 et de 39,4 % pour une teneur en humidité de 30 %.

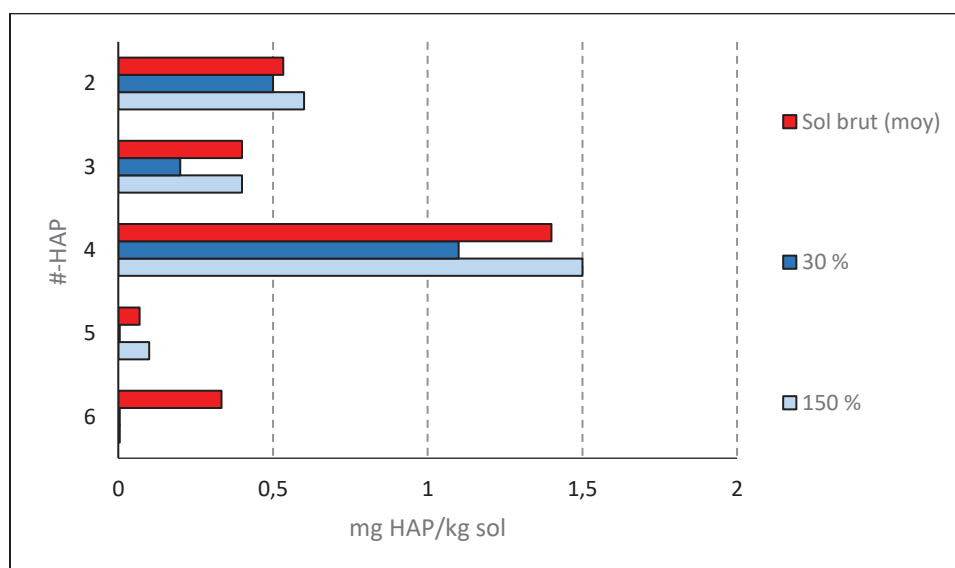


Figure 3.10 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus* avec différentes teneurs en humidité

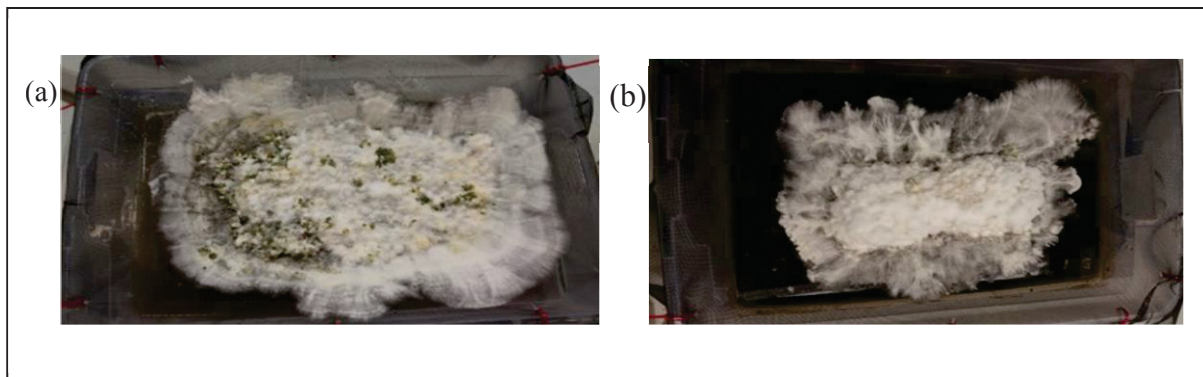


Figure 3.11 Traitement par le *P. ostreatus*-1 après 21 jours sous diverses conditions de croissance à (a) 30 % et (b) 150 % d'humidité

3.2.3 Traitement par *P. ostreatus* avec vaporisation d'eau à la surface

Le traitement par vaporisation d'eau a permis l'obtention des meilleurs résultats au jour 14 (Figure 3.12). Quant au traitement par vaporisation d'un mélange constitué d'eau et de mycélium, les meilleurs résultats ont été obtenus au jour 7 (Figure 3.13). Dans les deux cas, les moins bons résultats ont été obtenus au jour 21 (augmentation des HAP). Quant au C10-C50, les valeurs sont variables, avec une augmentation des taux de contamination entre les jours 14 et 21 (Tableau 3.2). Cette augmentation peut être causée par la variabilité de la contamination initiale du sol industriel à l'essai. Visuellement, la contamination de l'essai par un autre champignon est visible à la surface (Figure 3.14). Ceci suggère que la présence d'un autre champignon peut avoir un impact sur les mécanismes de dégradation ou que la variabilité de l'échantillonnage affecte les résultats.

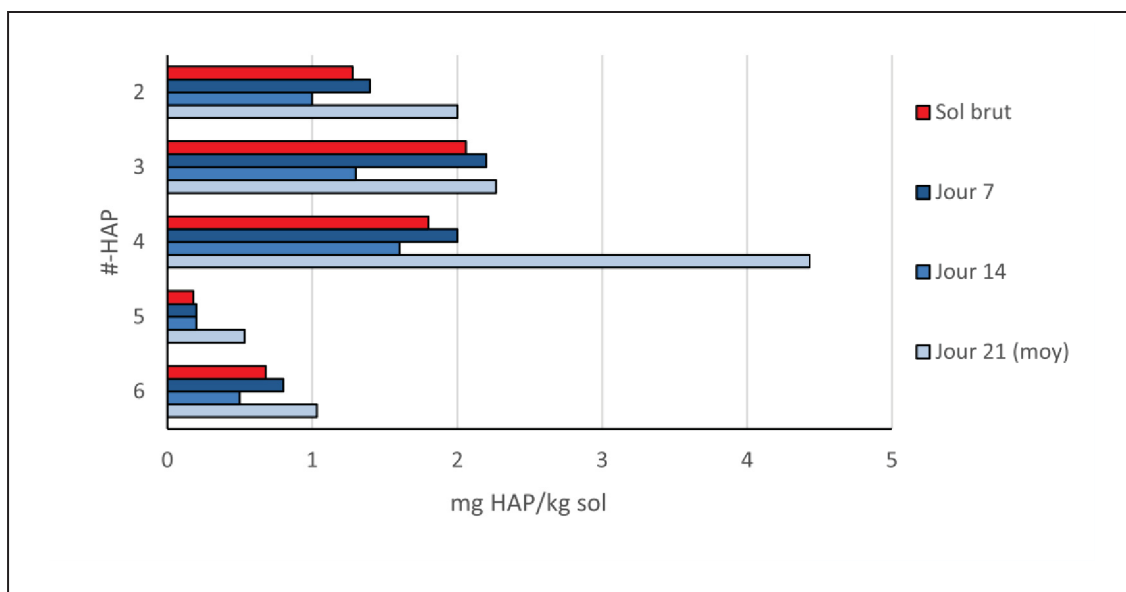


Figure 3.12 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus*-1 avec vaporisation d'eau à la surface du sol une fois par semaine

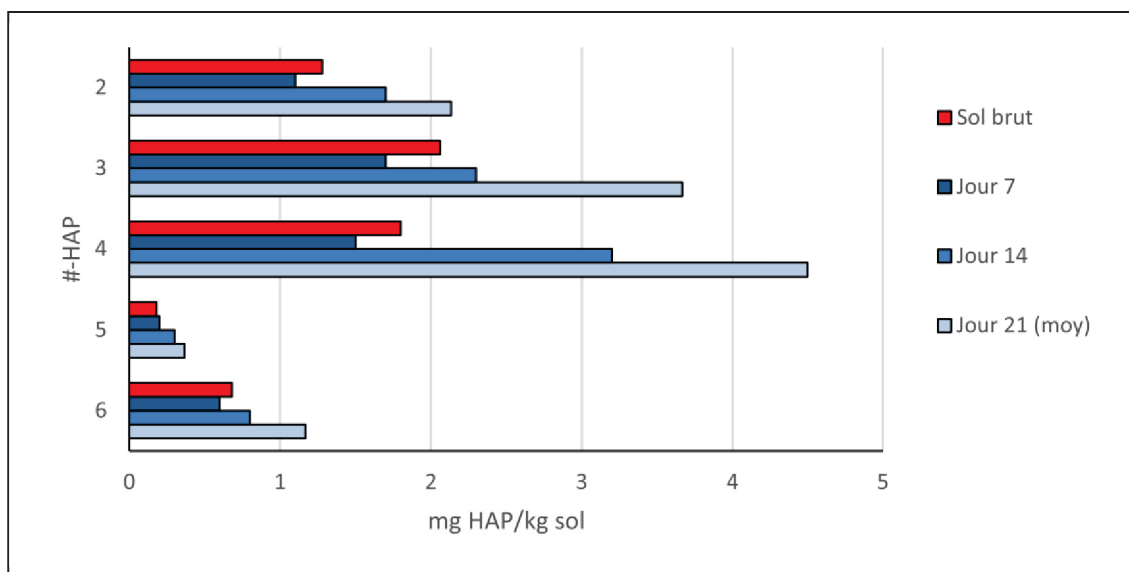


Figure 3.13 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus*-1 avec vaporisation d'eau chargée en mycélium à la surface du sol une fois par semaine

Tableau 3.2 Changements dans les taux de contamination avant, durant et après traitement

Traitement	Taux de contamination C10-C50 (mg/kg sol)
Avant traitement	4786
Vaporisation d'eau et de mycélium (jour 7)	5300
Vaporisation d'eau et de mycélium (jour 14)	3300
Vaporisation d'eau et de mycélium (jour 21)	4200
Vaporisation d'eau (jour 7)	4900
Vaporisation d'eau (jour 14)	3600
Vaporisation d'eau (jour 21)	4300

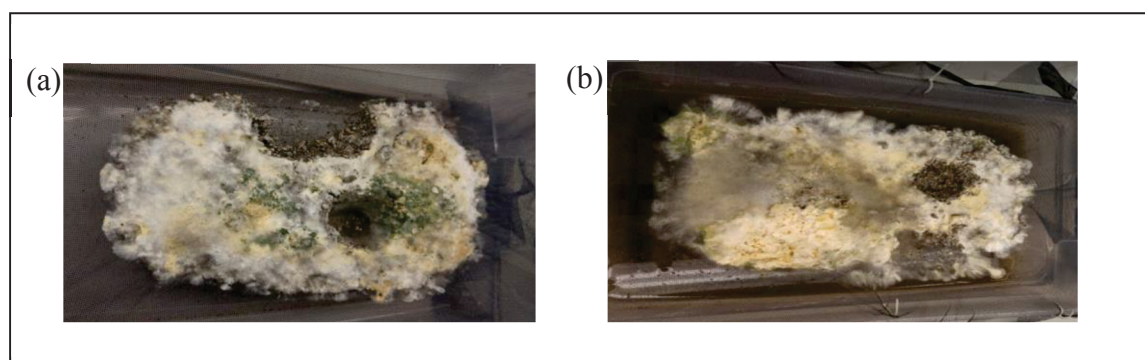


Figure 3.14 Comparaison entre la vaporisation d'eau deux fois par semaine (a) avec mycélium et (b) sans mycélium

3.2.4 Effet de l'homogénéisation du mélange sol – *P. ostreatus*

Des augmentations et des diminutions du taux de contamination par les HAP ont été observées suite aux homogénéisations des mélanges (Figure 3.15). L'élimination des 5-HAP et 6-HAP a été observée au jour 7 avec une concentration totale allant de 2,7 à 1,9 mg/kg sol (sol initial : 2,7 mg/kg sol). Les 2-HAP et 3-HAP ont observée une augmentation du taux de contamination de 50,0 et 192,7 % respectivement. Les taux de contamination des C10-C50 ont quant à eux diminué par rapport à la teneur initiale de 3133 mg/kg sol, avec des abattements de 39,4 % (jour 7) et de 20,2 % (jour 21). Visuellement, l'homogénéisation limite l'inoculation du champignon dans le sol, possiblement à cause d'un effet négatif lié à la perturbation du

champignon durant la phase d'expansion (Figure 3.16). Ces essais suggèrent que l'homogénéisation contribue à la dégradation des 5-HAP et 6-HAP ainsi que les C10-C50, mais pas à celle des 2-HAP et 3-HAP.

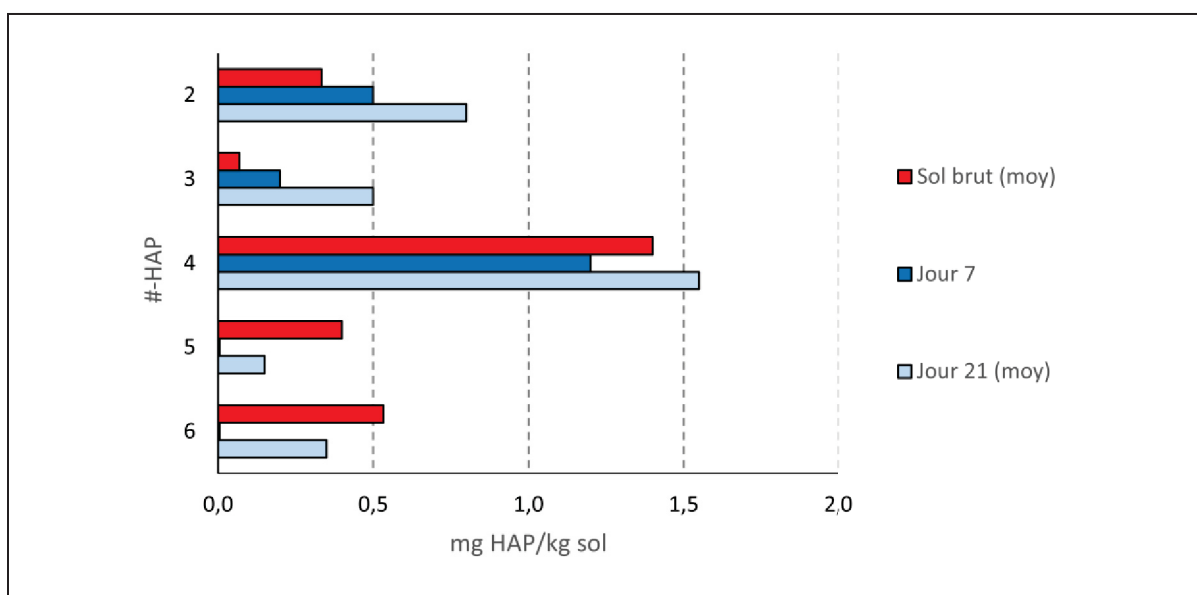


Figure 3.15 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus*-1, homogénéisé une fois par semaine



Figure 3.16 Traitement par le *P. ostreatus* après 21 jours, homogénéisé une fois par semaine.

3.2.5 Effet de l'échantillonnage de sol brut

Pour tenter de réduire l'impact de la variation des teneurs de contamination au sol, l'objectif principal lors de ces essais était de voir l'effet lié au prélèvement de plusieurs échantillons (3) du sol brut sur les taux de traitement des contaminants en place du prélèvement d'un seul échantillon. Les taux de contamination des sols bruts sont présentés au Tableau 3.3. Les résultats de traitement sont synthétisés à la Figure 3.17.

Tableau 3.3 Taux de contamination du sol brut en pile

Catégorie de contamination	Taux de contamination (mg/kg sol)
2-HAP	1,3
3-HAP	2,1
4-HAP	1,8
5-HAP	0,2
6-HAP	0,7
C10-C50	3133

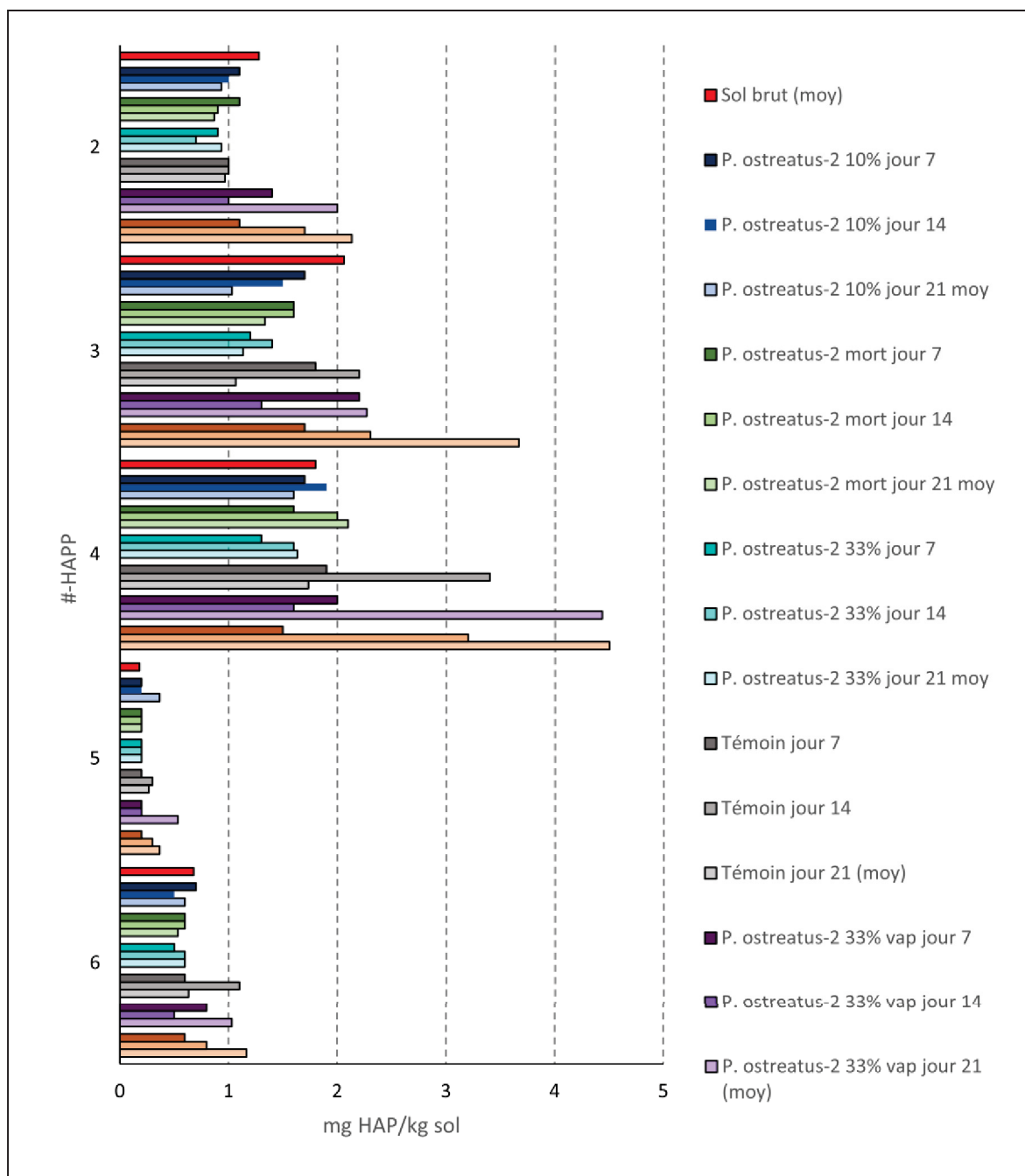


Figure 3.17 Taux de dégradation des HAP suite au traitement par le *P. ostreatus*-2 avec modification de la méthode d'échantillonnage du sol brut

Témoin

Après 3 semaines, le sol témoin, soumis aux mêmes conditions que celles des traitements par champignon, a observé des augmentations et des diminutions respectives des taux de contamination allant jusqu'à 88,9 % (4-HAP, jour 14) et 47,6 % (3-HAP, jour 21) (Figure 3.17). Quant aux C10-C50, les taux de contamination ont augmenté aux jours 7, 14 et 21 de 14,9 %, 10,1 % et 12,8 % respectivement. La différence entre les taux de contamination du sol brut et ceux obtenus durant et après le traitement peut être expliquée par la variabilité locale du taux de contamination dans le sol initial. Ceci renforce l'idée que la variabilité des taux de contamination initiaux dans le sol affecte directement les résultats obtenus.

P. ostreatus-2 10 %

Pour les HAP, ce traitement a mené à une augmentation des taux de contamination au jour 7 (14,9 %), au jour 14 (6,6 %) et au jour 21 (2,4 %). Ce traitement a conduit à une augmentation des taux de contamination des C10-C50, initialement 4786 mg/kg sol, de 14,9 % (jour 7), de 10,1 % (jour 14) et de jour 21 (14,9 %). Ces résultats suggèrent *P. ostreatus*-2 à 10 % ne permet pas de dégrader des hydrocarbures.

P. ostreatus-2 mort

Suite au traitement, les teneurs observées en 2-HAP et 3-HAP ont respectivement baissé de 32,3 et 35,3 %. Les concentrations de 5-HAP et de 6-HAP sont demeurées inchangées ou ont diminué de 21% (6-HAP, jour 7). Les concentrations C10-C50 ont soit augmenté, soit baissé durant l'essai. Une augmentation a été observée au jour 7 (4,5 %) et jour 21 (1,0 %). Au jour 14, une baisse de 10,2 % a été observée. Visuellement, d'autres champignons ont colonisé le sol (Figure 3.18). Cet essai suggère que la présence de *P. ostreatus*-2 mort dans le sol permet la dégradation des HAP et occasionne une augmentation des C10-C50, possiblement à cause d'autres champignons.



Figure 3.18 Traitement par *P. ostreatus* mort après 21 jours

P. ostreatus-2 à 33 %

Les taux de dégradation totale des HAP varient entre 31,7 % (jour 7) et 25 % (jours 14 et 21, moyenne). Plus spécifiquement, les taux de contamination des 5-HAP a augmenté de 11,1 %. Les autres HAP ont baissé de 9,25 % (4-HAP, jour 21) à 45,3 % (2-HAP). Les taux de dégradation étaient plus élevés au jour 7 et avec le temps, le taux de contamination se situait entre le taux de contamination avant traitement et celui du jour 7. Quant au C10-C50, les taux ont diminué après 7 jours (14,3 %), 14 jours (8,1 %) et 21 jours (7,4 %). Ce résultat suggère que *P. ostreatus*-2 est en mesure de dégrader les C10-C50. Ces résultats montrent que *P. ostreatus*-2 à une concentration de 33 % au sol permet de réduire les taux de contamination des HAP et des C10-C50 et, en même temps, soulève le fait que la variabilité du taux de contamination du sol présente un impact sur les résultats obtenus.

3.2.6 Effet du volume de sol

Visuellement, la croissance de champignon dans les bacs de 20 L s'est surtout concentrée aux surfaces extérieures. Au centre des bacs, peu de croissance a été observée. À la 14^e journée, 7 jours après la prise des premiers échantillons, de nouvelles croissances ont été observées aux parties du sol en contact avec l'air, ce qui suggère que l'air était absent du sol.

Le Laccase a été détecté dans tous les bacs de traitement, sauf celui où le traitement a été réalisé avec le champignon mort (Figure 3.19). La différence entre les taux d'activité peut être expliquée par les différentes concentrations d'enzymes dans le sol.

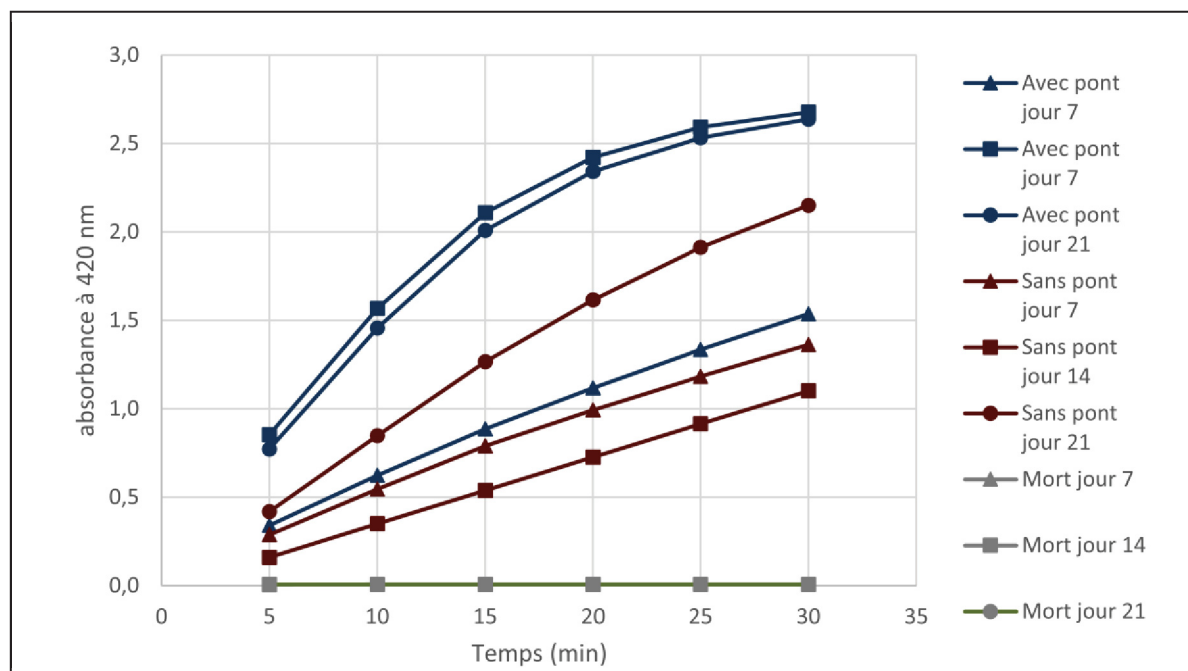


Figure 3.19 Détection de Laccase dans les bacs 20 L

P. ostreatus-2 mort

Les essais réalisés avec le champignon mort a mené à une augmentation des concentrations des HAP à chaque intervalle de temps (Figure 3.20). Le taux de contamination aux jours 7, 14 et 21 a augmenté de 11,7 %, 73,5 % et 241,6 % respectivement (Figure 3.20). Les concentrations de C10-C50 ont également augmenté; initialement à 4786 mg/kg sol avant traitement, la concentration a respectivement augmentée de 12,8 % (jour 7), de 6,6 % (jour 14) et de 18,4% (jour 21). Le traitement par le *P. ostreatus-2* mort ne contribue donc pas à la dégradation des contaminants.

P. ostreatus-2 avec pont capillaire

Les taux de dégradation des HAP par le *P. ostreatus-2* ont atteint 17,5 % (jour 7) et 3,8 % (jour 21) (Figure 3.21). Quant aux C10-C50, les taux de contamination du sol sont plus élevés durant l'expérience que le sol avant traitement, avec des augmentations de 6,6 % (jour 7), 35,8 % (jour 14) et 5,9 % (jour 21). Ceci indique que le champignon peut

dégrader les HAP avec l'apport d'eau via un pont capillaire. Les C10-C50 ne semblent pas dégradables avec l'apport d'eau additionnel.

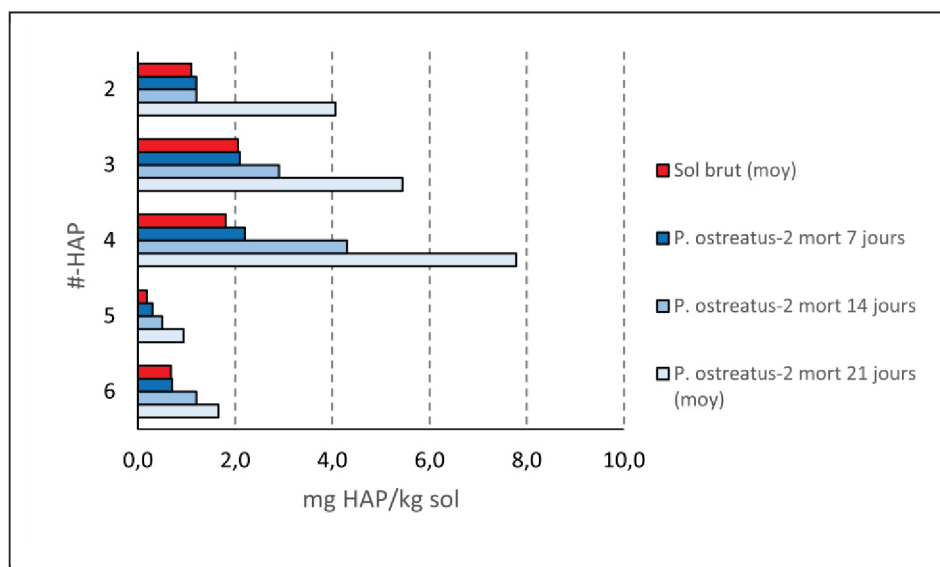


Figure 3.20 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus-2* mort dans un volume de 20 L

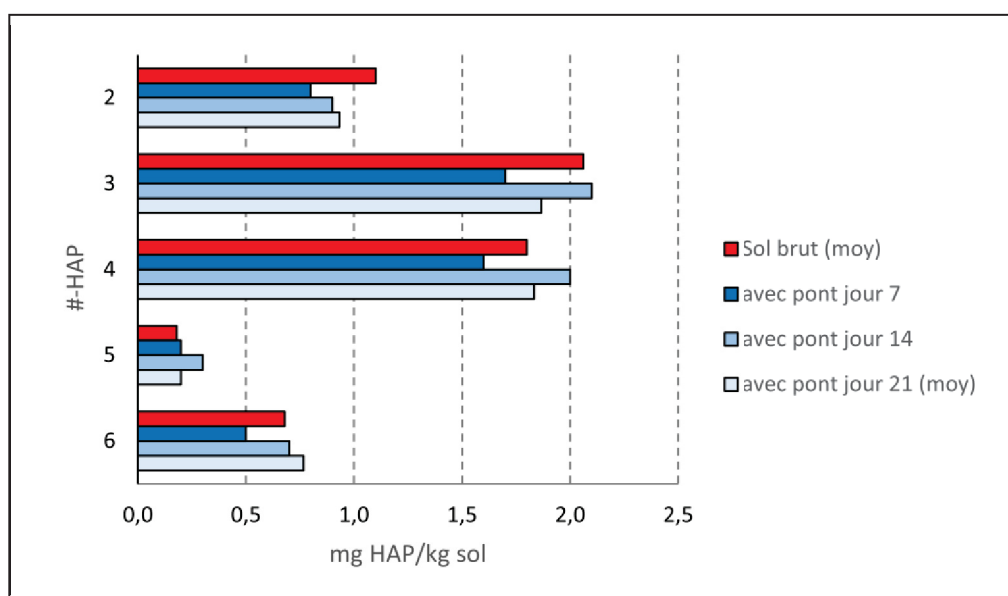


Figure 3.21 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus* avec pont capillaire dans un volume de 20 L

P. ostreatus-2 sans pont capillaire

Les concentrations de HAP ont diminué de 8,9 % (jour 7), 24,4 % (jour 14) et 3,2 % (jour 21) comme présentés à la Figure 3.22. Ceci indique que les HAP sont dégradables par *P. ostreatus*-2 avec l'ajout d'air humide seulement. Les C10-C50 sont toutefois moins aisément dégradables. La concentration de C10-C50 était 10,7 % plus élevée au jour 7, puis diminue respectivement de 20,6 % et de 2,5 % aux jours 14 et 21.

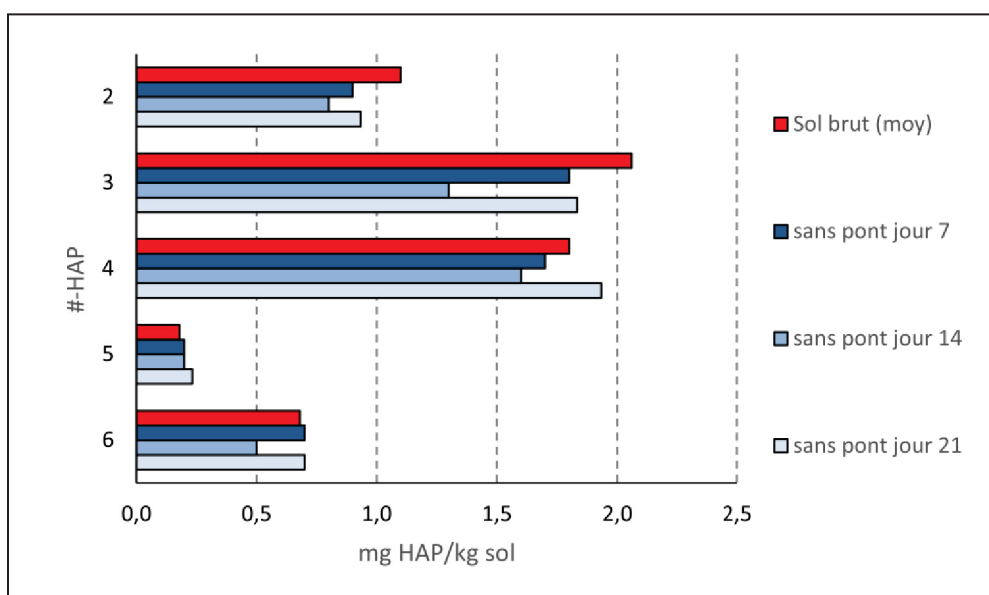


Figure 3.22 Comparaison du taux de contamination de sol traité par *P. ostreatus* sans aménagement d'un pont capillaire dans un volume de 20 L

3.2.7 Concentration des HAP

Ces essais visaient à étudier l'effet de la concentration des HAP sur la capacité de dégradation par le *P. ostreatus* (Figure 3.23). Cette série d'essais a été réalisée avec des échantillons de sols contaminés présentant une variabilité initiale importante dans la concentration des HAP, soit de 380 à 760 mg/kg sol. La variabilité initiale des concentrations de HAP dans les sols empêche de tirer des conclusions générales concernant la biodégradabilité par le *P. ostreatus*. Les résultats montrent qu'un taux élevé d'HAP n'inhibe pas la croissance de *P. ostreatus* (Figure 3.24).

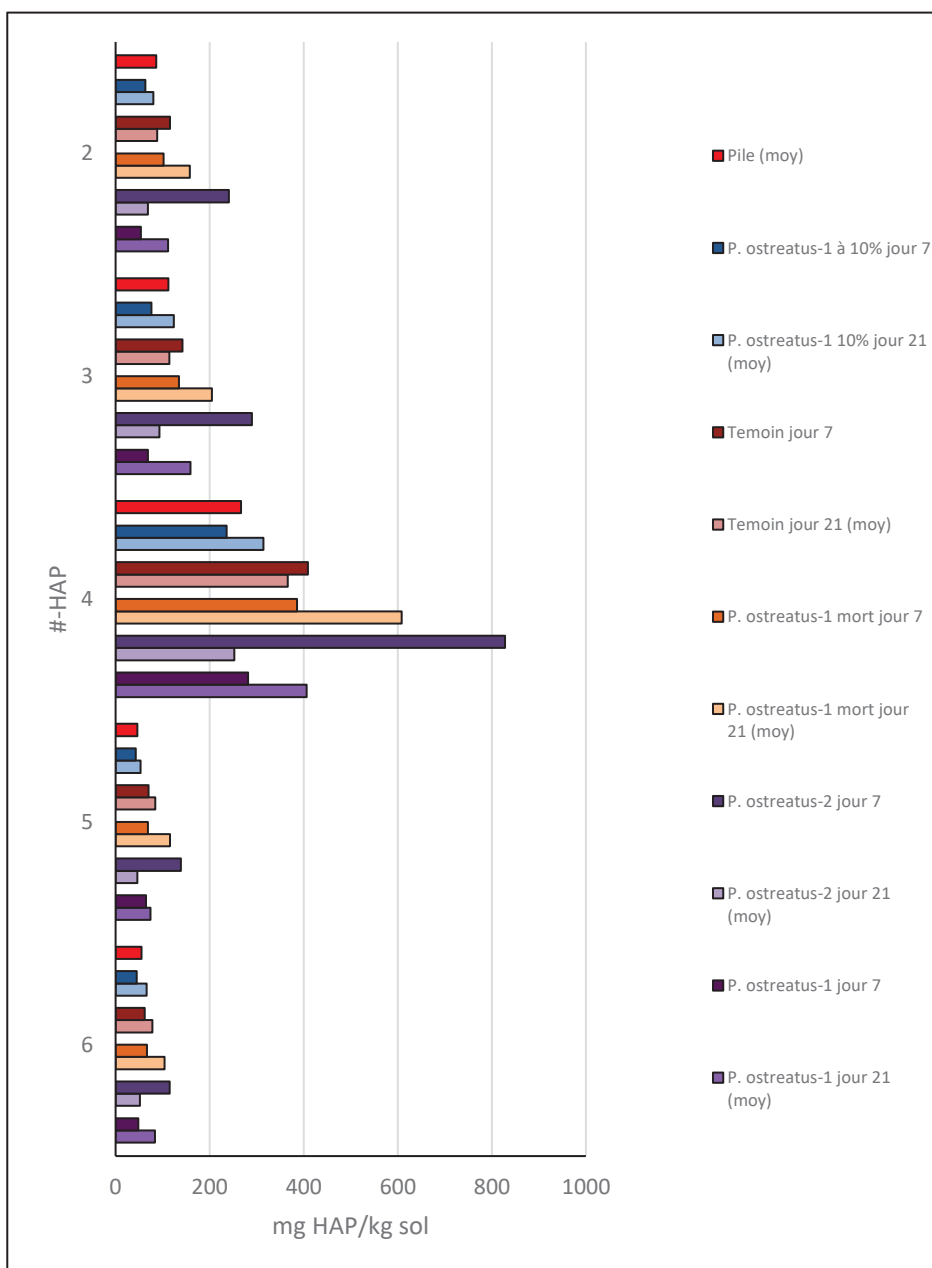


Figure 3.23 Taux de contamination des HAP dans un sol contaminé > C

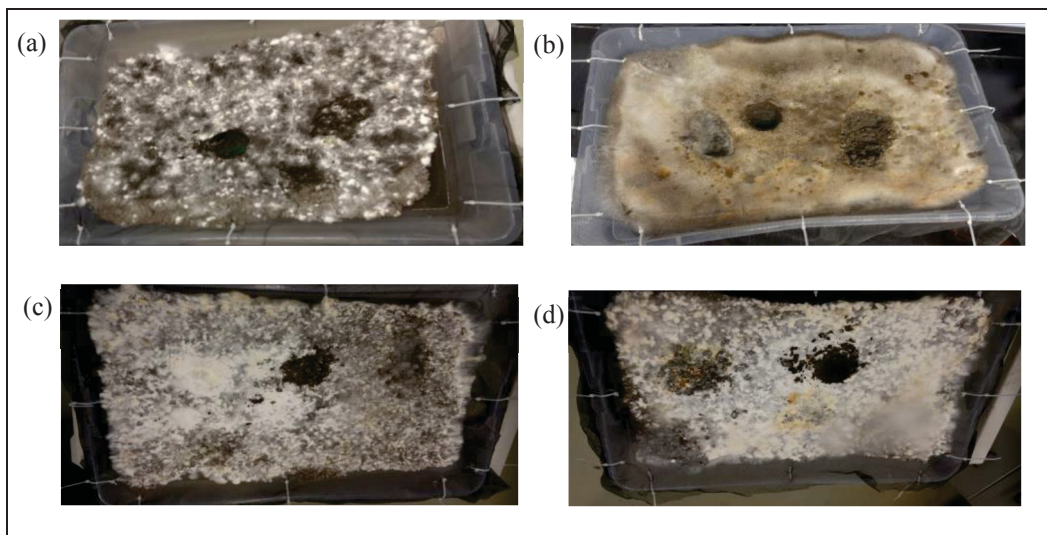


Figure 3.24 Croissance de *P. ostreatus* observée sous différentes conditions dans un sol fortement contaminé par les HAP (a) *P. ostreatus*-1 à 10 %, (b) Mort, (c) *P. ostreatus*-2 à 33 % et (d) *P. ostreatus*-1 à 33 %

Différents résultats ont été observés durant les essais de détection enzymatiques (Figure 3.25). Aucune activité de Laccase n'a été détectée pour l'essai témoin et *P. ostreatus*-1 mort au jour 7. Pour le *P. ostreatus*-1 mort au jour 21 et *P. ostreatus*-2 au jour 7, une baisse d'activité enzymatique a été détectée. La faible concentration de Laccase, ou d'autres enzymes pouvant interagir avec le Laccase expliquerait l'activation d'ABTS. Dans les essais restants, l'activité du Laccase a été détectée.

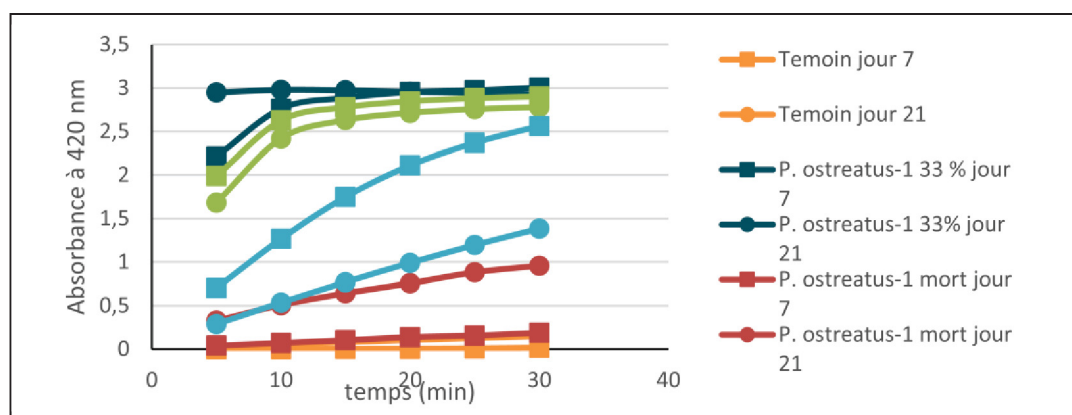


Figure 3.25 Détection de Laccase dans un sol contaminé > C par les HAP

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Pertinence de mycoremédiation

La mycoremédiation semble promouvoir, sous certaines conditions, la décontamination d'un sol contaminé de friche industrielle. La mycoremédiation nécessite l'utilisation d'une espèce de champignon particulière, car ce n'est pas tous les champignons qui produisent les enzymes spécifiques au substrat visé. Les conditions favorables doivent également être offertes aux champignons pour promouvoir leur croissance au sol.

Sur les 53 essais réalisés, 38 ont conduit à la dégradation des HAP par le *P. ostreatus*. Les diminutions des taux de contamination ont été observées pour tous les noyaux benzéniques (Tableau 4.1). Les traitements réalisés avec les bacs de 20 L avec homogénéisation, avec un apport d'humidité par vaporisation (avec et sans mycélium) et en sol fortement contaminé en HAP ne semblent pas affecter les capacités de dégradation du champignon *P. ostreatus*.

Malgré ces résultats, la variation observée de la contamination au sein des matrices de sols industriels testés a influencé les taux présentés ci-dessus. Dans les cas où un même sol a été échantillonné à plusieurs reprises pour réaliser des essais, les taux de contamination initiaux (avant traitement) ont varié de 69,0 % (de 2,3 à 3,3 mg/kg sol) à 49,5 % (de 380 à 767 mg HAP/kg sol). De futurs travaux de recherche en mycoremédiation devront davantage tenir compte de cette variabilité intrinsèque.

Tableau 4.1 Échantillons ayant montré une diminution de la concentration de HAP présents dans le sol

Contaminant	Pourcentage des échantillons (en nombre) ayant observé une diminution de la contamination
2-HAP	71,7
3-HAP	69,8
4-HAP	50,9
5-HAP	22,6
6-HAP	54,7

Une durée de 21 jours semble suffisante pour démarrer la dégradation des HAP du sol. Les études ultérieures devraient élaborer le potentiel de *P. ostreatus* sur une base temporelle plus importante, de l'ordre de plusieurs mois. Le ratio « sol : substrat inoculé » devrait être maintenu à 2 : 1 en raison du succès récurrent de ces essais. Une durée plus longue pourrait conduire à la dégradation de la matière organique en humus, et promouvoir davantage les microorganismes du sol; cet aspect n'a pas été exploré lors de la présente étude.

4.1.1 Détection enzymatique

Les expériences de détection enzymatique ont confirmé que la croissance de *P. ostreatus* est jumelée à la présence de Laccase. Or, les essais confirment uniquement la présence de Laccase dans l'échantillon et ne spécifient pas la localisation du champignon (environnement intracellulaire ou extracellulaire). De plus, les analyses enzymatiques ne permettent pas de porter un jugement sur la concentration de l'enzyme. Aussi, l'indication de la présence de Laccase n'offre aucune information sur la dégradation des contaminants par cette enzyme.

Cette étude est la première ayant étudié le potentiel de *P. ostreatus* à dégrader les C10-C50. Les résultats suggèrent qu'un mécanisme de dégradation des C10-C50 existe en présence de ce champignon. Davantage d'études devraient être menées sur la production d'enzymes ayant la capacité à dégrader les C10-C50. Le *P. ostreatus* est un champignon lignivore; son

environnement typique est sur les arbres. Ce champignon excrète une variété d'enzymes pour dégrader la lignine. Les enzymes catalysent une réaction d'oxydoréduction particulière. L'enzyme Laccase est considérée comme responsable de la dégradation des HAP. Aucune étude à ce jour n'a exploré les liens entre le système enzymatique de la *P. ostreatus* et les C10-C50.

Tel que mentionné précédemment, la présente étude s'est limitée qu'à des détections enzymatiques. La présence de Laccase et de Lipase a ainsi été confirmée par spectrométrie lors de certains essais. Cette approche est basée sur la réaction entre l'enzyme et un substrat particulier qui change l'absorbance du milieu. Or, le ABTS réagit avec les peroxydases et les oxydases multi cuivrées (Kadnikova et Kostić, 2002; Rowland et Niederweis, 2013). Le Laccase est une enzyme parmi d'autres qui réagit avec l'ABTS. Pour valider la présence de Laccase et de Lipase, des analyses de transfert de protéines sont nécessaires.

4.1.2 Aspect réglementaire

Au total, 17 % et 10 % des essais réalisés avec le *P. ostreatus* ont observé une diminution dans le taux réglementaire des HAP et de C10-C50 respectivement (D à C ou C à B ou B à A). L'encadrement réglementaire A, B, C et D contraste avec la diminution des concentrations totale des contaminants. À partir du moment qu'un contaminant est présent au-dessus d'une limite, l'échantillon porte cette valeur de classification. Malgré la diminution de la concentration absolue par *P. ostreatus*, les traitements ont eu peu d'impact sur les taux de contamination réglementaire. Les études ultérieures devraient étudier l'effet du temps (mois, années) sur les taux de contamination réglementaire.

4.2 Échelle industrielle de mycoremédiation

Croissance

Un des objectifs de cette étude consistait à établir des bases techniques pour mettre en œuvre la mycoremédiation à l'échelle industrielle. Ce travail a ainsi abordé l'étude de la fonctionnalité de différentes approches pour garantir la présence d'humidité dans le sol et

assurer la colonisation du champignon au sol. Il semble que les conditions de croissance pour *P. ostreatus* requièrent peu interventions sur le milieu. D'autres conditions de croissance, tel qu'un environnement humide et aéré est essentiel pour la croissance du champignon.

Volume de sol

Les essais réalisés avec des volumes de sol de 20 L ont mis en évidence différents problèmes par rapport à ceux réalisés en faibles volumes (3 L), notamment en ce qui concerne l'apport d'oxygène et d'humidité. Les essais de traitement de 20 L ont montré que le champignon a de la difficulté à croître dans une masse importante de sol. Pour assurer le cheminement d'air humide au sol, de multiples puits (orifices) pourraient être créés à travers la masse de sol.

Développement d'une technologie

La mycoremédiation se classifie comme une technologie biologique qui permet de détruire les contaminants. Le type d'approche élaboré au cours de la présente étude souligne la pertinence de la mycoremédiation comme technique *ex-situ*. La mycoremédiation est une approche complémentaire aux autres. La capacité de dégradation des hydrocarbures par les champignons offre un avantage sur certaines technologies biologiques qui détruisent les contaminants *ex-situ*. Les champignons, pouvant dégrader différents substrats incluant certains déchets industriels, pourraient être jumelés avec un résidu de support industriel (bran de scie par exemple) et assurer la décontamination de sol tout en valorisant les déchets. À l'échelle industrielle, les paramètres environnementaux et opérationnels de traitement ne sont pas encore développés. Il faudra d'abord étudier comment d'éventuels puits (orifices) peuvent contrôler l'environnement du sol et à quel point le climat et les saisons jouent un rôle dans le succès de la mycoremédiation à l'échelle industrielle.

4.2.1 Comparaison de mycoremédiation aux autres technologies

L'utilisation de champignons semble adaptée pour la décontamination de sols contaminés. Davantage d'efforts doivent être mis sur l'étude des facteurs contrôlant la colonisation du champignon dans le sol (taux d'humidité, concentration d'enzymes, environnement

extracellulaire). Des recherches fondamentales sur le champignon et son interaction avec son environnement s'avèrent nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes qui gèrent le succès d'un projet de mycoremédiation.

Le développement de technologies apporte de nouvelles connaissances. L'utilisation de champignons pour dégrader les contaminants du sol mènera à une meilleure compréhension du rôle du champignon dans l'environnement. Cela permettra d'en connaître davantage sur sa flexibilité environnementale, étant donné que *P. ostreatus* n'est pas un champignon de sol.

Les sols contaminés de friches industrielles posent des problèmes quant à sa décontamination. La versatilité du champignon constitue son avantage, mais également sa vitesse de croissance. Les champignons peuvent également croître dans des milieux liquides signifiant que d'autres approches de mycoremédiation peuvent être envisagées. Ce type de traitement n'a pas été étudié lors de la présente étude. La décontamination des hydrocarbures en phase dissoute (liquide) par *P. ostreatus* nécessite certainement des conditions environnementales spécifiques qui méritent également d'être étudiées.

CONCLUSION

Les sols contaminés constituent un problème courant dans la société. Ils posent divers risques pour la santé humaine et les écosystèmes. Les hydrocarbures sont présents dans 70 % des 4195 terrains contaminés répertoriés au Québec. Il existe une variété de technologies pour réhabiliter les terrains contaminés. Un prétraitement est parfois nécessaire pour réduire le volume de sol à traiter ou pour transformer la forme dans laquelle les contaminants se trouvent.

Les champignons se distinguent d'autres règnes par la sécrétion des enzymes dans l'environnement extracellulaire. Cette caractéristique génétique leur procure un avantage théorique sur d'autres traitements biologiques, qui requiert l'adsorption des contaminants dans l'environnement intracellulaire. Les champignons produisent des enzymes capables d'oxyder (dégrader) les hydrocarbures. La présente étude visait principalement à déterminer si la sécrétion enzymatique de champignons permet de réhabiliter un sol industriel contaminé de friches industrielles.

Deux familles d'hydrocarbures (HAP et C10-C50) ont été sélectionnées en raison de la récurrence de leur présence dans les sols contaminés au Québec et dans le monde. Une enzyme fongique a été attribuée pour chacun des hydrocarbures. L'enzyme Laccase, produite par *P. ostreatus*, oxyde les HAP. L'enzyme Lipase, produite par *M. rouxii*, *A. versicolor*, et *P. simplicissimum*, oxyde les C10-C50. Ces espèces de champignons ont été utilisées lors des essais pour déterminer les capacités fongiques à réhabiliter un sol contaminé. Les champignons ont été développés sur des substrats solides et ensuite homogénéisés avec le sol contaminé avant traitement. La présence d'enzymes dans le mélange a été vérifiée par des analyses enzymatiques. Les taux de contamination des sols ont également été mesurés avant et après traitement par le champignon.

Les expériences préliminaires ont déterminé l'effet du support solide et du champignon sur la dégradation des contaminants. Les résultats ont montré que le support solide et les champignons *M. rouxii*, *A. versicolor* et *P. simplicissimum* ne permettent pas d'abaisser le taux

de contamination des HAP, ni des C10-C50. Le traitement par *P. ostreatus* a quant à lui conduit à une dégradation de près de 45 % des HAP (50 % de la contamination totale, avec baisse du niveau réglementaire) et des C10-C50 (45 % de la contamination totale, avec baisse du niveau réglementaire) après 21 jours. La différence entre les taux de dégradation obtenus après 21 jours et ceux à 35 jours a été considérée comme négligeable. L'utilisation de champignons morts n'a pas mené à une diminution des taux de contamination.

La stratégie d'échantillonnage lors des essais « ratio sol : substrat inoculé » a certainement occasionné un biais dans les taux d'enlèvement observés, mais cela n'enlève pas le fait que le champignon a dégradé les contaminants. Le taux d'humidité a également permis d'augmenter le taux de dégradation lors des essais (jusqu'à 34 % des HAP et 30 % des C10-C50). Ceci établit que l'humidification des sols constitue un facteur-clef pour le succès de la mycoremédiation.

Les autres essais de traitement réalisés ont conduit parfois à des diminutions, parfois des augmentations de taux de contamination après traitement par *P. ostreatus*. Jusqu'à 47 % des HAP ont pu être éliminés d'un sol contaminé > C. Or, cette valeur est statistiquement sans signifiante en raison de la variabilité du sol contaminé brut (398 à 767 mg HAP/kg sol). Il faut ainsi considérer que certaines diminutions observées lors des essais puissent être davantage occasionnées par une variabilité dans les résultats qu'un véritable effet de biodégradabilité.

Davantage de recherches fondamentales s'avèrent nécessaires pour approfondir les connaissances sur la sécrétion enzymatique et s'assurer que les enzymes viennent en contact avec tous les contaminants adsorbés dans les microspores du sol. Il faut également développer des connaissances sur la croissance du champignon dans le sol et les stratégies liées à son utilisation, notamment à des échelles industrielles, puisque la production enzymatique varie selon le niveau de contraintes rencontrées.

ANNEXE I

SITES CONTAMINÉS AU QUÉBEC

Tableau A-I 1 Profil des terrains contaminés au registre du MDDELCC en date du 11 novembre 2016

Région géographique	Terrains contaminés (actuels)	Terrains contaminés par HAP	Terrains contaminés par C10-C50	Terrains contaminés par HAP et C10-C50	Terrains contaminés par HAP et autres	Terrains contaminés par C10-C50 et autres	Terrains contaminés par autres	Terrains contaminés par C10-C50, HAP et autres	Terrains contaminés par non-listés dans la politique
Abitibi-Témiscamingue	54	0	7	4	2	15	9	14	3
Bas-Saint-Laurent	64	2	11	15	0	14	10	10	2
Capitale-National	204	5	48	20	14	25	19	54	19
Centre-du-Québec	99	3	31	19	4	13	11	3	15

Tableau A-I 1 Profil des terrains contaminés au registre du MDDELCC en date du 11 novembre 2016 (suite)

Région géographique	Terrains contaminés (actuels)	Terrains contaminés par HAP	Terrains contaminés par C10-C50	Terrains contaminés par HAP et C10-C50	Terrains contaminés par HAP et autres	Terrains contaminés par C10-C50 et autres	Terrains contaminés par autres	Terrains contaminés par C10-C50, HAP et autres	Terrains contaminés par non-listé dans la politique
Chaudière-Appalaches	188	2	38	11	10	47	32	29	19
Côte-Nord	69	6	23	11	1	12	4	4	8
Estrie	73	2	8	9	7	11	10	21	5
Gaspésie-Îles-de-la-Madeleine	438	2	28	8	0	4	374	4	18
Lanaudière	102	3	39	16	2	10	16	7	9
Laurentides	103	3	22	12	3	14	14	28	7
Laval	61	16	12	13	1	4	6	1	8
Mauricie	102	2	29	11	10	8	14	9	19

Tableau A-I 1 Profil des terrains contaminés au registre du MDDELCC en date du 11 novembre 2016 (suite)

Région géographique	Terrains contaminés (actuels)	Terrains contaminés par HAP	Terrains contaminés par C10-C50	Terrains contaminés par HAP et C10-C50	Terrains contaminés par HAP et autres	Terrains contaminés par C10-C50 et autres	Terrains contaminés par autres	Terrains contaminés par C10-C50, HAP et autres	Terrains contaminés par non-listé dans la politique
Montréal	1348	54	547	78	27	185	164	77	216
Montréal	791	91	162	159	84	78	70	119	28
Nord-du-Québec	81	0	33	9	0	12	5	13	9
Outaouais	224	11	88	16	5	28	26	10	40
Saguenay—Lac-Saint-Jean	194	2	68	9	3	33	43	26	10
Total	4195	204	1194	420	173	513	827	530	434

ANNEXE II

TECHNOLOGIES DE RÉHABILITATION DES SOLS CONTAMINÉS

Tableau A-II 1 Les technologies thermiques qui détruisent les hydrocarbures de terrains contaminés

Situation	Nom	Description
<i>Ex situ</i>	Désorption thermique	Un sol chargé de contaminants chemine vers un four à 560°C. En quelques minutes, selon le taux de contamination et les propriétés physicochimiques du sol, jusqu'à 95 % des contaminants peuvent être dégradés (Colombano et al., 2010).
	Incinération	Un sol chargé de contaminants chemine vers une chambre de combustion à 1000°C. Les facteurs environnementaux de la chambre de combustion (ex. : température, oxygène, turbulence) doivent être contrôlés pour obtenir un taux de destruction de 99,9 % (Colombano et al., 2010).
	Oxydation thermique	Le gaz, provenant du sol et chargé de polluants, chemine vers une chambre de combustion qui le chauffe jusqu'à 1400°C. Les facteurs environnementaux (ex. : température, temps de séjour dans la chambre de combustion, etc.) doivent être contrôlés pour obtenir un taux de destruction de 99,9 % (Colombano et al., 2010).
	Réduction thermique	Les gaz sont chauffés de 800 à 900°C en présence d'hydrogène afin de provoquer leur réduction (Colombano <i>et al.</i> , 2010)

Tableau A-II 2 Les technologies biologiques qui détruisent les hydrocarbures de terrains contaminés

Situation	Nom	Description
<i>In situ</i>	Atténuation naturelle	Dans la zone saturée, sans intervention humaine, les contaminants sont dégradés par l'activité microbienne. La surveillance ponctuelle est nécessaire pour atteindre les objectifs de la réhabilitation. L'atténuation naturelle peut atteindre un taux supérieur à 70 % (Colombano et al., 2010).
	Biosparging	Dans la zone saturée du sol, de l'air est ajouté par des puits d'injection pour stimuler la biodégradation. Pour atteindre un taux de dégradation élevé (> 90 %), il faut une combinaison favorable des caractéristiques de sol et de contaminants (Colombano et al., 2010).
	Bioventing	Dans la zone non-saturée, de l'air passe à travers le sol par une série de puits d'injection et d'extraction. Des nutriments sont ajoutés au sol pour atteindre des taux de décontamination du sol supérieurs à 90 % (Colombano et al., 2010).
<i>Ex situ</i>	Biopile	Entouré par du béton et une géomembrane imperméable, le sol contaminé homogénéisé avec un agent de structurant est exposé à des conditions environnementales qui favorisent la croissance des bactéries pour dégrader les contaminants. La promotion des conditions de croissance des bactéries permet d'atteindre un taux de dégradation supérieur à 90 % (Colombano et al., 2010).

Tableau A-II 2 Les technologies biologiques qui détruisent les hydrocarbures de terrains contaminés (suite)

Situation	Nom	Description
<i>Ex situ</i> (suite)	Bioréacteur air	Un gaz, provenant du sol et chargé de polluants, chemine à travers un lit bactérien. Les contaminants rentrent en contact direct avec les bactéries qui les dégradent. Pour obtenir un taux de dégradation élevé (90 %), il faut s'assurer que les bactéries ont accès aux nutriments (Colombano et al., 2010). De l'eau est passé à travers le sol contaminé pour dissoudre les contaminants. Ensuite, dans une lagune ou une série de lagunes construites spécifiquement pour la décontamination, les microorganismes et les plantes sont mis en contact avec les eaux chargées de contaminants afin de les dégrader. La technologie dépend des débits d'eau (et du temps de séjour de l'eau dans les lagunes) ainsi que de la concentration des contaminants et des nutriments (Colombano et al., 2010).
	Bioréacteur extensif eau	De l'eau est passée à travers le sol contaminé pour dissoudre les contaminants. Ensuite, dans une lagune ou une série de lagunes construites spécifiquement pour la décontamination, les microorganismes et les plantes sont mis en contact avec les eaux chargées de contaminants afin de les dégrader. La technologie dépend des débits d'eau (et du temps de séjour de l'eau dans les lagunes) ainsi que de la concentration des contaminants et des nutriments (Colombano et al., 2010).
	Bioréacteur sols	Un sol chargé de contaminants chemine vers un bioréacteur où il est homogénéisé avec de l'eau, des nutriments et de l'air. Les bactéries, qui peuvent dégrader jusqu'à 99 % des contaminants, peuvent être indigènes ou étrangères (Colombano et al., 2010).

Tableau A-II 2 Les technologies biologiques qui détruisent les hydrocarbures de terrains contaminés (suite)

Situation	Nom	Description
<i>Ex situ</i> (suite)	Bioréacteur intensif eau	De l'eau est passé à travers le sol contaminé pour dissoudre les contaminants. Ensuite, dans un bioréacteur, l'eau chargée de contaminants est mise en contact avec les microorganismes aérobies. Ce contact permet la biodégradation des contaminants. Pour obtenir un taux de biodégradation élevé (> 90 %), plusieurs facteurs environnementaux doivent être ajustés au profil de contamination : température, concentration des contaminants, teneurs en nutriments, temps de séjour et aération. Suite au traitement, un clarificateur sépare l'eau traitée des boues (Colombano et al., 2010).
	Compostage	Du compost est homogénéisé avec le sol contaminé pour stimuler la biodégradation des contaminants. Un taux de dégradation aussi élevé que 95 % est réalisable si la concentration de nutriments, le taux d'humidité et la température sont favorables (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Landfarming	Les sols contaminés sont étalés selon une mince couche (inférieure à 30 cm) pour favoriser la biodégradation aérobie. Un taux de dégradation supérieur à 90 % est atteint grâce à l'ajout des nutriments, au contrôle du pH, de l'humidité et de la température (Colombano et al., 2010).

Tableau A-II 3 Les technologies chimique qui détruisent les hydrocarbures de terrains contaminés

Situation	Nom	Description
<i>In situ</i>	Oxydation ou réduction	Dans la zone saturée ou non-saturé, un agent oxydant est mis en contact avec les contaminants pour les détruire. Des catalyseurs sont parfois utilisés pour obtenir des enlèvements élevés (jusqu'à 95 %) (Colombano et al., 2010).
<i>Ex situ</i>	Oxydation ou réduction	Dans un réacteur agité, le sol contaminé est homogénéisé avec de l'eau et un agent oxydant ou réducteur jusqu'à création d'une boue. La réaction chimique transforme les contaminants en molécules non-toxiques. Les sols sont ensuite déshydratés (Colombano et al., 2010).

Tableau A-II 4 Les technologies qui stabilisent les hydrocarbures de terrains contaminés

Situation	Nom	Description
<i>In situ</i>	Vitrification	Les sols pollués sont ajoutés dans un four pour vitrifier la terre. Les contaminants sont volatilisés, puis interceptés par un traitement de gaz. Les contaminants peuvent également être piégés dans la vitre (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Pyrolyse ou thermolyse	En absence d'oxygène, les sols sont chauffés pour extraire les contaminants. Cela fonctionne exactement comme la vitrification/désorption, mais sans oxygène (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Solidification et stabilisation	Un produit de fixation est introduit au sol pour que la mobilité des contaminants soit réduite, voire éliminée (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Confinement par couverture et étanchéification	Une couverture est introduite au sol pour empêcher la dispersion des contaminants. La couverture agit comme une barrière entre les contaminants, les animaux et les plantes (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
<i>Ex situ</i>	Enfouissement	Les sols du terrain sont excavés, puis cheminés hors-site pour leur enfouissement (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Encapsulation	L'approche consiste à encapsuler les sols contaminés pour que les contaminants ne causent aucun problème sur la santé ou sur l'environnement (Colombano <i>et al.</i> , 2010).

Tableau A-II 5 Méthodes à réduire le volume de sol à traiter

Phase finale des contaminants	Nom de traitement	Description
Gaz	Désorption thermique	De l'air chaud ou de la vapeur d'eau est injecté puis extrait du sol à l'aide des puits. L'air, chargé de contaminants, est traité par un charbon actif ou un biofiltre (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Barbotage <i>in situ</i>	Un gaz est injecté dans la zone saturée. Ce gaz rentre en contact avec les contaminants et se volatilise. Le gaz chargé de contaminants est expulsé du sol à l'aide d'un puit d'extraction (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Ventilation de la zone non-saturé	Cette technologie est fondée sur les propriétés de volatilisation des contaminants. De l'air passe à travers la zone contaminée à l'aide des puits d'injection et d'extraction. Le passage d'air dans le sol volatilise les contaminants. L'air extrait, chargé de contaminants, est traité pour enlever les contaminants (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
Liquide	Pompage et traitement	Un puit d'extraction est implanté dans le sol. L'eau chargée de contaminants est amenée à la surface, puis traitée (Colombano <i>et al.</i> , 2010).
	Lavage	De l'eau avec ou sans produits ajoutés est injectée dans le sol, puis pompée pour un traitement de surface. Les particules fines de sol sont mélangées avec une solution extractante pour dissoudre les contaminants. L'eau doit être traitée avant d'être rejetée (Colombano <i>et al.</i> , 2010).

Tableau A-II 5 Méthodes à réduire le volume de sol à traiter (suite)

Phase finale des contaminants	Nom de traitement	Description
Liquide (suite)	Pompage-écrémage	Un puit extrait le surnageant.
Sol	Tri granulométrique	Le sol contaminé est excavé, puis cheminé vers un crible à barreaux (bar grizzly) pour isoler le sol contaminé du remblai.
Pluriphase	Extraction double phase	Le puits d'extraction aspire les polluants sous forme pur, dissous et gazeux vers la surface où un système les isole du milieu (Colombano <i>et al.</i> , 2010).

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adebayo-Tayo, B., Jonathan, S., Popoola, O., & Egbomuche, R. (2011). Optimization of growth conditions for mycelial yield and exopolysaccharide production by *Pleurotus ostreatus* cultivated in Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 5(15), 2130-2138.
- Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., & Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Research*, 37(16), 3897-3904. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00313-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00313-0). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135403003130>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), 31-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1018364714000792>
- Anderson, C. (2016). *Potential of Pleurotus ostreatus to remediate diesel-contaminated soil in subarctic mesocosms* (University of Alaska Fairbanks).
- Anderson, L., & Laberge, J. (2003). *Guide de caractérisation des terrains*.
- Andersson, B., & Henrysson, T. (1996). Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46(5-6), 647-652.
- Asghar, H. N., Rafique, H. M., Zahir, Z. A., Khan, M. Y., Akhtar, M. J., Naveed, M., & Saleem, M. (2016). Petroleum Hydrocarbons-Contaminated Soils: Remediation Approaches. Dans K. R. Hakeem, J. Akhtar & M. Sabir (Éds.), *Soil Science: Agricultural and Environmental Prospectives* (pp. 105-129). Cham: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-34451-5_5. Repéré à http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-34451-5_5
- Asghar, R., Tariq, M., & Rehman, T. (2007). Propagation of *Pleurotus sajor-caju* (oyster mushroom) through tissue culture. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1383.
- Ashraf, J., Ali, M. A., Ahmad, W., Ayyub, C. M., & Shafi, J. (2013). Effect of different substrate supplements on oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) production. *Food Science and Technology*, 1(3), 44-51.

- Bak, F., Bonnicksen, L., Jørgensen, N. O. G., Nicolaisen, M. H., & Nybroe, O. (2015). The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1475-1483. doi: 10.1007/s00253-014-6054-3. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-014-6054-3>
- Bakatula, E. N., Straker, C. J., Cukrowska, E. M., Weiersbye, I. M., Mihaly-Cozmata, L., & Tutu, H. (2015). A zeoponic system modified with *Penicillium simplicissimum* for the removal of trace elements from aqueous solutions and gold mine leachates. *Journal of Geochemical Exploration*, 156, 34-43. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.04.012>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037567421500076X>
- Bell, T. H., El-Din Hassan, S., Lauron-Moreau, A., Al-Otaibi, F., Hijri, M., Yergeau, E., & St-Arnaud, M. (2014). Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *ISME J*, 8(2), 331-343. doi: 10.1038/ismej.2013.149. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2013.149>
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (1996). Initial Oxidation Products in the Metabolism of Pyrene, Anthracene, Fluorene, and Dibenzothiophene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, 62(7), 2554-2559.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P., & Cerniglia, C. E. (1996). Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, 62(7), 2547-2553.
- Bhatt, M., Cajthaml, T., & Šásek, V. (2002). Mycoremediation of PAH-contaminated soil. *Folia Microbiologica*, 47(3), 255-258. doi: 10.1007/bf02817647. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/BF02817647>
- Bhattacharya, S., Das, A., Prashanthi, K., Palaniswamy, M., & Angayarkanni, J. (2014). Mycoremediation of Benzo[a]pyrene by *Pleurotus ostreatus* in the presence of heavy metals and mediators. *3 Biotech*, 4(2), 205-211. doi: 10.1007/s13205-013-0148-y. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-013-0148-y>
- Biache, C., Mansuy-Huault, L., & Faure, P. (2014). Impact of oxidation and biodegradation on the most commonly used polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) diagnostic ratios: Implications for the source identifications. *Journal of Hazardous Materials*, 267, 31-39.
- Boekema, B. K., Beselin, A., Breuer, M., Hauer, B., Koster, M., Rosenau, F., Jaeger, K.-E., & Tommassen, J. (2007). Hexadecane and Tween 80 stimulate lipase production in

- Burkholderia glumae by different mechanisms. *Applied and environmental microbiology*, 73(12), 3838-3844.
- Breuil, C., Shindler, D., Sijher, J., & Kushner, D. (1978). Stimulation of lipase production during bacterial growth on alkanes. *Journal of bacteriology*, 133(2), 601-606.
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Micro*, 13(10), 620-630. doi: 10.1038/nrmicro3480. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Cébron, A., Beguiristain, T., Bongoua-Devisme, J., Denonfoux, J., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Parisot, N., Peyret, P., & Leyval, C. (2015). Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environmental science and pollution research*, 22(18), 13724-13738.
- Chang, Y.-T., Lee, J.-F., Liu, K.-H., Liao, Y.-F., & Yang, V. (2016). Immobilization of fungal laccase onto a nonionic surfactant-modified clay material: application to PAH degradation. *Environmental science and pollution research*, 23(5), 4024-4035. doi: 10.1007/s11356-015-4248-6. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-015-4248-6>
- Chen, X. Y., Mulder, J., Wang, Y. H., Zhao, D. W., & Xiang, R. J. (2004). Atmospheric Deposition, Mineralization and Leaching of Nitrogen in Subtropical Forested Catchments, South China. *Environmental Geochemistry and Health*, 26(2), 179-186. doi: 10.1023/B:EGAH.0000039580.79321.1a. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1023/B:EGAH.0000039580.79321.1a>
- Colombano, S., Saada, A., Guerin, V., Batillard, P., Bellenfant, G., Beranger, S., Hube, D., C., B., Zornig, C., & Girardeau, I. (2010). *Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices*. France: Bureau de recherches géologiques et minière.
- Covino, S., Svobodová, K., Čvančarová, M., D'Annibale, A., Petruccioli, M., Federici, F., Křesinová, Z., Galli, E., & Cajthaml, T. (2010). Inoculum carrier and contaminant bioavailability affect fungal degradation performances of PAH-contaminated solid matrices from a wood preservation plant. *Chemosphere*, 79(8), 855-864. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.02.038>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653510002171>
- di Luccio, M., Capra, F., Ribeiro, N. P., Vargas, G. D. L. P., Freire, D. M. G., & de Oliveira, D. (2004). Effect of temperature, moisture, and carbon supplementation on lipase production by solid-state fermentation of soy cake by *Penicillium simplicissimum*. *applied biochemistry and biotechnology*, 113(1), 173-180. doi: 10.1385/abab:113:1-3:173. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1385/ABAB:113:1-3:173>

- Díaz, R., Téllez-Téllez, M., Sánchez, C., Bibbins-Martínez, M. D., Díaz-Godínez, G., & Soriano-Santos, J. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and genes expression profiles of laccase of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16(4), 6-6.
- Duan, L., Naidu, R., Liu, Y., Palanisami, T., Dong, Z., Mallavarapu, M., & Semple, K. T. (2015). Effect of ageing on benzo[a]pyrene extractability in contrasting soils. *Journal of Hazardous Materials*, 296, 175-184. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389415003489>
- Duan, L., Naidu, R., Thavamani, P., Meaklim, J., & Megharaj, M. (2015). Managing long-term polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soils: a risk-based approach. *Environmental science and pollution research*, 22(12), 8927-8941.
- Duarte, J. G., Silva, L. L. S., Freire, D. M. G., Cammarota, M. C., & Gutarra, M. L. E. (2015). Enzymatic hydrolysis and anaerobic biological treatment of fish industry effluent: Evaluation of the mesophilic and thermophilic conditions. *Renewable Energy*, 83, 455-462. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.04.056>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148115003365>
- Giraldo, M. C., Dagdas, Y. F., Gupta, Y. K., Mentlak, T. A., Yi, M., Martinez-Rocha, A. L., Saitoh, H., Terauchi, R., Talbot, N. J., & Valent, B. (2013). Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Nature communications*, 4.
- Glogauer, A., Martini, V. P., Faoro, H., Couto, G. H., Müller-Santos, M., Monteiro, R. A., Mitchell, D. A., de Souza, E. M., Pedrosa, F. O., & Krieger, N. (2011). Identification and characterization of a new true lipase isolated through metagenomic approach. *Microbial Cell Factories*, 10, 54-54. doi: 10.1186/1475-2859-10-54. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3161859/>
- Godoy, M. G., Gutarra, M. L. E., Castro, A. M., Machado, O. L. T., & Freire, D. M. G. (2011). Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38(8), 945-953. doi: 10.1007/s10295-010-0865-8. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0865-8>
- Gomez, F., & Sartaj, M. (2014). Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). *International Biodeterioration and biodegradation*, 89, 103-109.
- Gutarra, M. L. E., Godoy, M. G., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (2007). Inoculum strategies for *Penicillium simplicissimum* lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. *Journal of Chemical*

- Technology & Biotechnology*, 82(3), 313-318. doi: 10.1002/jctb.1674. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1674>
- Haas, D., Lesch, S., Buzina, W., Galler, H., Gutschi, A. M., Habib, J., Pfeifer, B., Luxner, J., & Reinthaler, F. F. (2016). Culturable fungi in potting soils and compost. *Medical Mycology*, 54(8), 825-834.
- Hernández-Vega, J. C., Cady, B., Kayanja, G., Mauriello, A., Cervantes, N., Gillespie, A., Lavia, L., Trujillo, J., Alkio, M., & Colón-Carmona, A. (2017). Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Arabidopsis thaliana* involves a putative flavonol synthase. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 268-280. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.08.058>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389416307804>
- Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., & Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39(11), 1415-1419. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00267-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00267-X). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003295920300267X>
- Hu, X., Wang, C., Wang, L., Zhang, R., & Chen, H. (2014). Influence of temperature, pH and metal ions on guaiacol oxidation of purified laccase from *Leptographium qinlingensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1285-1290. doi: 10.1007/s11274-013-1554-3. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-013-1554-3>
- Ipeaiyeda, A. R., Nwauzor, G. O., & Akporido, S. O. (2015). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Agricultural Soil Contaminated with Crude Oil from Nigeria Refinery using *leurotus sajor-caju*. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 2015.
- Irshad, M., Asgher, M., Sheikh, M. A., & Nawaz, H. (2011). *PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACCASE PRODUCED BY Schyzophyllum commune IBL-06 IN SOLID STATE CULTURE OF BANANA STALKS* (Vol. 6). Repéré à http://ojs.cnr.ncsu.edu/index.php/BioRes/article/view/BioRes_06_3_2861 Irshad AS N_Purific_Charac_Laccase_Banana
- Jayasinghe, P. A., Hettiaratchi, J. P. A., Mehrotra, A. K., & Kumar, S. (2014). Reaction mechanisms and rate constants of waste degradation in landfill bioreactor systems with enzymatic-enhancement. *Bioresource Technology*, 162, 279-282. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.147>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414004520>

- Jodeh, S., Khalaf, O., Obaid, A. A., Hammouti, B., Hadda, T. B., Jodeh, W., Haddad, M., & Warad, I. (2014). Adsorption and kinetics study of abamectin and imidacloprid in greenhouse soil in palestine. *J Mater Environ Sci*, 5, 571-580.
- Johnsen, A., Wick, L., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation. *Environmental Pollution*, 133, 71-84.
- Johnsen, A., Wick, L., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1), 71-84. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2004.04.015>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749104001587>
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 869-883. doi: 10.1007/s00018-014-1826-6. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6>
- Kadnikova, E. N., & Kostić, N. M. (2002). Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass.: Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 18(1-3), 39-48. doi: [http://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00057-7](http://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00057-7). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381117702000577>
- Kanwar, L., Gogoi, B. K., & Goswami, P. (2002). Production of a Pseudomonas lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. *Bioresource Technology*, 84(3), 207-211.
- Kumari, J., & Negi, S. (2014). Development of bioprocess for the production of laccase by Pleurotus ostreatus MTCC 1802 using evolutionary optimization technique.
- Kwon, M. J., Lee, G., Hwang, Y. H., Lee, M., & Yang, J.-S. (2016). Effects of Soil Micro-particles and Micro-pores on Petroleum Hydrocarbons Released From Contaminated Soils During Solvent Extraction with Ultrasound. *Water, air & soil pollution*, 227(9), 1-9. doi: 10.1007/s11270-016-3071-0. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-016-3071-0>
- Lalaoui, N., Elouarzaki, K., Le Goff, A., Holzinger, M., & Cosnier, S. (2013). Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes. *Chemical Communications*, 49(81), 9281-9283.
- Lejeune, R., & Baron, G. V. (1997). Simulation of growth of a filamentous fungus in 3 dimensions. *Biotechnology and Bioengineering*, 53(2), 139-150. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<139::AID-BIT3>3.0.CO;2-P. Repéré à [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19970120\)53:2<139::AID-BIT3>3.0.CO;2-P](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19970120)53:2<139::AID-BIT3>3.0.CO;2-P)

- Lettera, V., Del Vecchio, C., Piscitelli, A., & Sannia, G. (2011). Low impact strategies to improve ligninolytic enzyme production in filamentous fungi: The case of laccase in *Pleurotus ostreatus*. *Comptes rendus biologies*, 334(11), 781-788. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2011.06.001>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069111001533>
- Lin, Q., Mendelssohn, I. A., Graham, S. A., Hou, A., Fleeger, J. W., & Deis, D. R. (2016). Response of salt marshes to oiling from the Deepwater Horizon spill: Implications for plant growth, soil surface-erosion, and shoreline stability. *Science of The Total Environment*, 557–558, 369-377. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.049>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716304752>
- Liu, H., Xu, J., Liang, R., & Liu, J. (2014). Characterization of the Medium- and Long-Chain n-Alkanes Degrading *Pseudomonas aeruginosa* Strain SJTD-1 and Its Alkane Hydroxylase Genes. *PloS one*, 9(8), e105506. doi: 10.1371/journal.pone.0105506. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0105506>
- Liu, S.-H., Zeng, G.-M., Niu, Q.-Y., Liu, Y., Zhou, L., Jiang, L.-H., Tan, X.-f., Xu, P., Zhang, C., & Cheng, M. (2017). Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresource Technology*, 224, 25-33. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852416316169>
- Liu, Z., Zeng, Z., Zeng, G., Li, J., Zhong, H., Yuan, X., Liu, Y., Zhang, J., Chen, M., Liu, Y., & Xie, G. (2012). Influence of rhamnolipids and Triton X-100 on adsorption of phenol by *Penicillium simplicissimum*. *Bioresource Technology*, 110, 468-473. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.092>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412001162>
- Lu, S.-G., Malik, Z., Chen, D.-P., & Wu, C.-F. (2014). Porosity and pore size distribution of Ultisols and correlations to soil iron oxides. *catena*, 123, 79-87.
- Mansur, M., Arias, M. E., Copa-Patiño, J. L., Flärdh, M., & González, A. E. (2003). The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isozymes with different substrate specificities. *Mycologia*, 95(6), 1013-1020.
- Margesin, R. (2014). Bioremediation and biodegradation of hydrocarbons by cold-adapted yeasts. Dans *Cold-adapted Yeasts* (pp. 465-480). Springer.
- Matsui, T., Yamamoto, T., Shinzato, N., Mitsuta, T., Nakano, K., & Namihira, T. (2014). Degradation of oil tank sludge using long-chain alkane-degrading bacteria. *Annals of Microbiology*, 64(1), 391-395. doi: 10.1007/s13213-013-0643-8. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-013-0643-8>

- McCracken, F. (1972). Sporulation of *Pleurotus ostreatus*. *Canadian Journal of Botany*, 50(11), 2111-2115.
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, 99(16), 7842-7847. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085240800134X>
- Morelli, I., Nazareno Saparrat, M., Del Panno, M., Coppotelli, B., & Arrambari, A. (2013). Bioremediation of PAH-Contaminated soil by fungi. Dans E. Goltapeh (Éd.), *Fungi as bioremediators* (Vol. 32, pp. 159-179). Verlag: Springer.
- Mukhopadhyay, A., Dasgupta, A. K., & Chakrabarti, K. (2015). Enhanced functionality and stabilization of a cold active laccase using nanotechnology based activation-immobilization. *Bioresource Technology*, 179, 573-584. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.070>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414018161>
- Novotny, C., Erbanova, P., Sasek, V., Kubatova, A., Cajhaml, T., Lang, E., Krahel, J., & Zadrazil, F. (1999). Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. *Biodegradation*, 10, 159-168.
- Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajhaml, T., Kasinath, A., Lang, E., & Sasek, V. (2004). Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil biology & biochemistry*, 36(10), 1545-1551.
- Oliveira, V., Gomes, N. C. M., Almeida, A., Silva, A. M. S., Simões, M. M. Q., Smalla, K., & Cunha, Â. (2014). Hydrocarbon contamination and plant species determine the phylogenetic and functional diversity of endophytic degrading bacteria. *Molecular Ecology*, 23(6), 1392-1404. doi: 10.1111/mec.12559. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1111/mec.12559>
- Park, J., Pham, H. V., Mogensen, K., Solling, T. I., Vad Bennetzen, M., & Houk, K. (2015). Hydrocarbon binding by proteins: Structures of protein binding sites for $\geq$ C10 linear alkanes or long-chain alkyl and alkenyl groups. *The Journal of organic chemistry*, 80(2), 997-1005.
- Parks, A. E. a. (2016). *Alberta Tier 1 Soil and Groundwater Remediation Guidelines*.
- Peixoto, R. S., Vermelho, A. B., & Rosado, A. S. (2011). Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. *Enzyme Research*, 2011, 7. doi: 10.4061/2011/475193. Repéré à <http://dx.doi.org/10.4061/2011/475193>

- Pichtel, J. (2016). Oil and Gas Production Wastewater: Soil Contamination and Pollution Prevention. *Applied and Environmental Soil Science*, 2016, 24. doi: 10.1155/2016/2707989. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2707989>
- Pozdnyakova, N., Chernyshova, M., Grinev, V., Landesman, E., Koroleva, O., & Turkovskaya, O. (2016). Degradation of fluorene and fluoranthene by the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(6), 621-628.
- Pozdnyakova, N. N., Chernyshova, M. P., Grinev, V. S., Landesman, E. O., Koroleva, O. V., & Turkovskaya, O. V. (2016). Degradation of fluorene and fluoranthene by the basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 52(6), 621-628. doi: 10.1134/s0003683816060132. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1134/S0003683816060132>
- Prada, I., Furlan, R., Matteoli, M., & Verderio, C. (2013). Classical and unconventional pathways of vesicular release in microglia. *Glia*, 61(7), 1003-1017.
- Ramos-Sánchez, L. B., Cujilema-Quitio, M. C., Julian-Ricardo, M. C., Cordova, J., & Fickers, P. (2015). Fungal lipase production by solid-state fermentation. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 2015.
- Rasoulnia, P., Mousavi, S. M., Rastegar, S. O., & Azargoshasb, H. (2016). Fungal leaching of valuable metals from a power plant residual ash using *Penicillium simplicissimum*: Evaluation of thermal pretreatment and different bioleaching methods. *Waste Management*, 52, 309-317. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.04.004>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X16301672>
- Reid, B., Jones, K., & Semple, K. (2000). Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective on mechanisms, consequences and assessments. *Environmental Pollution*, 108, 103-112.
- Rein, A., Adam, I. K. U., Miltner, A., Brumme, K., Kästner, M., & Trapp, S. (2016). Impact of bacterial activity on turnover of insoluble hydrophobic substrates (phenanthrene and pyrene)—Model simulations for prediction of bioremediation success. *Journal of Hazardous Materials*, 306, 105-114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.12.005>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438941530265X>
- Riding, M., Doick, K., Martin, F., Jones, K., & Semple, K. (2013). Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: fundamentals to application. *Journal of Hazardous Materials*, 261, 687-700.
- Rocha, I., Pinto, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O., da Silva, M. V., & Oliveira, R. S. (2014). Influence of mixtures of acenaphthylene and benzo[a]anthracene on their degradation

- by *Pleurotus ostreatus* in sandy soil. *Journal of Soils and Sediments*, 14(4), 829-834. doi: 10.1007/s11368-013-0804-1. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-013-0804-1>
- Rodriguez, E., Nuero, O., Guillen, F., Martinez, A. T., & Martinez, M. J. (2004). Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four *Pleurotus* species: the role of laccase and versatile peroxidase. *Soil biology & biochemistry*, 36, 909-916.
- Rowland, J. L., & Niederweis, M. (2013). A Multicopper Oxidase Is Required for Copper Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 195(16), 3724-3733. doi: 10.1128/JB.00546-13. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3754562/>
- Sack, U., & Günther, T. (1993). Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities. *Journal of basic microbiology*, 33(4), 269-277.
- Salihu, A., Alam, M. Z., AbdulKarim, M. I., & Salleh, H. M. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 58, 36-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.10.007>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344911002187>
- Sardar, H., Ali, M. A., Ayyub, C. M., & Ahmed, R. (2016). EFFECTS OF DIFFERENT CULTURE MEDIA, TEMPERATURE AND pH LEVELS ON THE GROWTH OF WILD AND EXOTIC PLEUROTUS SPECIES. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 27(2), 139-145.
- Schutzendubel, A., Majcherczyk, A., Johannes, C., & Huttermann, A. (1999). Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43(3), 93-100.
- Silva, J. N., Godoy, M. G., Gutarra, M. L., & Freire, D. M. (2014). Impact of Extraction Parameters on the Recovery of Lipolytic Activity from Fermented Babassu Cake. *PloS one*, 9(8), e103176.
- Silva, J. N., Godoy, M. G., Gutarra, M. L. E., & Freire, D. M. G. (2014). Impact of Extraction Parameters on the Recovery of Lipolytic Activity from Fermented Babassu Cake. *PloS one*, 9(8), e103176. doi: 10.1371/journal.pone.0103176. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0103176>
- Sousa, C. D. (2001). Contaminated sites: The Canadian situation in an international context. *Journal of Environmental Management*, 62(2), 131-154. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jema.2001.0431>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479701904311>

- Sukor, M. Z., Yin, C.-Y., Savory, R. M., & Abdul-Talib, S. (2012). Biodegradation Kinetics of Naphthalene in Soil Medium Using *Pleurotus Ostreatus* in Batch Mode with Addition of Fibrous Biomass as a Nutrient. *Bioremediation Journal*, 16(3), 177-184. doi: 10.1080/10889868.2012.687417. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1080/10889868.2012.687417>
- Thavamani, P., Smith, E., Kavitha, R., Mathieson, G., Megharaj, M., Srivastava, P., & Naidu, R. (2015). Risk based land management requires focus beyond the target contaminants—A case study involving weathered hydrocarbon contaminated soils. *Environmental Technology & Innovation*, 4, 98-109. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352186415000176>
- Tomy, G. T., Halldorson, T., Chernomas, G., Bestvater, L., Danegerfield, K., Ward, T., Pleskach, K., Stern, G., Atchison, S., Majewski, A., Reist, J. D., & Palace, V. P. (2014). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites in Arctic Cod (*Boreogadus saida*) from the Beaufort Sea and Associative Fish Health Effects. *Environmental Science & Technology*, 48(19), 11629-11636. doi: 10.1021/es502675p. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1021/es502675p>
- Treu, R., & Falandysz, J. (2017). Mycoremediation of hydrocarbons with basidiomycetes—a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 52(3), 148-155. doi: 10.1080/03601234.2017.1261536. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1080/03601234.2017.1261536>
- Válková, H., Novotný, Č., Malachová, K., Šlosarčíková, P., & Fojtík, J. (2017). Effect of bacteria on the degradation ability of *Pleurotus ostreatus*. *Science of The Total Environment*, 584–585, 1114-1120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.171>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717301882>
- van der Perk, M. (2006). *Soil and water contamination* (2nd éd.). Leiden: Escher Company B.V.
- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F., & van der Heijden, M. G. A. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5266-5270. doi: 10.1073/pnas.1320054111. Repéré à <http://www.pnas.org/content/111/14/5266.abstract>
- Wang, Z., Xu, Z., Zhao, J., Pan, B., Song, X., & Xing, B. (2014). Effects of Low-Molecular-Weight Organic Acids on Soil Micropores and Implication for Organic Contaminant Availability. *Communications in soil science and plant analysis*, 45, 1120-1132.

- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H.-C. (2012). *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Springer Science & Business Media.
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y., & Tani, Y. (2002). Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 828-831. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00065-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00065-0). Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022902000650>
- Yuan, L., Chen, Z., Zhu, Y., Liu, X., Liao, H., & Chen, D. (2013). Hydrolysis of birch wood by simultaneous ball milling, dilute citric acid, and fungus *Penicillium simplicissimum* treatment at room temperature. *Journal of Applied Polymer Science*, 128(5), 3338-3345.
- Zadrazil, F. (1975). Influence of CO₂ concentration on the mycelium growth of three pleurotus species. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 1(4), 327-335. doi: 10.1007/bf01382692. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1007/BF01382692>