

INTÉRÊT DES CHAMPIGNONS TELLURIQUES DANS DES PROCESSUS DE BIOREMEDIATION DE SOLS POLLUES PAR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

Catherine Rafin*, Etienne Veignie*, Patrice Woisel**, Fabrice Cazier***

*Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO)

**ULCO, Laboratoire de synthèse organique et environnement,

***ULCO, Centre commun de mesure

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants ubiquistes et persistants dont certains posent de réels problèmes pour l'environnement et la santé publique. Parmi les différentes techniques de réhabilitation actuellement disponibles, la bioremédiation s'est développée lors de ces dernières décades comme une alternative rentable et prometteuse. De nombreuses études ont mis en évidence l'aptitude des champignons de type lignolytique à dégrader les HAP. Cependant, l'origine non tellurique de ces champignons les rend peu compétitifs par rapport à la microflore endogène du sol. Dans une optique de bioremédiation, nous avons conduit des travaux de recherche afin d'utiliser le potentiel biotechnologique de champignons telluriques et en particulier de *Fusarium solani*.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous and persistent pollutants that cause great environmental and health concern, because of their genotoxic and carcinogenic properties. Among the processes whereby these compounds are removed from the environment, microbial degradation plays a major role in the remediation of contaminated sites. Numerous biodegradation studies have been done on fungi, especially on various white rot fungi such as *Phanerochaete chrysosporium*, under *in vitro* and *in vivo* conditions. The installation of these foreign fungi in non sterile soils are quite hazardous due to intense negative interactions with indigenous soil microorganisms. Optimising the degradation of PAH by the indigenous microbial community that had already been adapted to the soil habitat would be probably more economical and equally efficient. In our studies, we focused therefore on the ability of telluric fungi for PAH field bioremediation processes. In particular, we isolated a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* that was able to grow in liquid medium with benzo[a]pyrene as sole carbon source and to mineralise this PAH. In a batch

fermentor, [7,10-¹⁴C]benz[a]pyrene mineralization occurred rapidly at early stages of fermentation (15 hr) during the germination of fungal spores and was not a continuous process as mineralization occurred in a biphasic pattern. Moreover, *Fusarium solani* showed an average rate of mineralization about 65 µg/g dry weight/day within 11 days of incubation, comparable as mineralization rate obtained with a white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*.

INTRODUCTION

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques représentent une classe de polluants très étudiés, inscrits depuis 1976 sur la liste des polluants prioritaires établis par l'American environmental protection agency (USEPA). Ces polluants, qui proviennent soit de sources naturelles soit de sources anthropogéniques, sont des composés hydrophobes très persistants dans les différents compartiments de l'environnement (atmosphère, sol, sédiment, eaux continentales et marines). Ils représentent un risque pour l'environnement et la santé humaine en raison des propriétés toxiques (génotoxicité et immunotoxicité) de certaines de ces molécules.

Les HAP, émis dans l'environnement et transportés par voie atmosphérique ou aqueuse, peuvent subir plusieurs phénomènes abiotiques conduisant à leur transformation tels que la volatilisation, la photo-oxydation, la sédimentation, l'oxydation chimique. Les phénomènes biotiques, tels que la biodégradation ou la biomagnification, représentent les phénomènes prépondérants de la transformation des HAP, en particulier dans les sols et les sédiments [1]. La biodégradation est en réalité un phénomène naturel basé sur le rôle important des microorganismes dans l'environnement, en tant

qu'agents biogéochimiques, intervenant dans la conversion partielle ou totale de molécules organiques complexes en métabolites allant parfois jusqu'à la production de CO₂ et d'H₂O. Dans ce cas, le terme de minéralisation est alors employé. La biorémédiation, procédé biotechnologique qui est l'utilisation intentionnelle de la diversité du métabolisme des microorganismes, consiste à stimuler ces phénomènes naturels pour en augmenter l'efficacité et le rendement [2].

Depuis plus de 30 ans, les recherches sur la dégradation microbienne des hydrocarbures aromatiques polycycliques ont permis d'isoler de nombreux genres et espèces de bactéries et de champignons capables de dégrader des HAP de faible poids moléculaires (composés contenant 3 cycles ou moins). Relativement peu de microorganismes sont capables de dégrader les HAP de haut poids moléculaire (tel que le benzo[a]pyrène ou BaP) qui persistent dans l'environnement indiquant une relative résistance à la dégradation tant chimique que biologique [3]. Parmi les microorganismes étudiés, certains champignons présentent des potentialités intéressantes pour la dégradation des HAP de haut poids moléculaire dans les sols pollués. De plus, le caractère invasif du mycélium leur permet d'augmenter à la fois le volume de sol prospecté et la surface de contact avec ces molécules insolubles [4]. Dans une optique de biorémédiation, l'originalité de notre approche consiste donc à utiliser le potentiel biotechnologique des champignons.

ISOLEMENT ET SCREENING

Isolement de souches fongiques telluriques

L'objectif de cette étude a été de réaliser, dans un premier temps, une collection de souches fongiques isolées de sols pollués. La microflore fongique isolée à partir de sols (contaminés artificiellement par du fioul) est consti-

Classe	Ordre	Genre
Zygomycotina	Mucorales	Mucor
Ascomycotina	Eurotiales	Penicillium
Deuteromycotina	Hyphales	Fusarium Trichoderma

Tableau 1 - Champignons telluriques isolés de sol – après enrichissement par du fioul

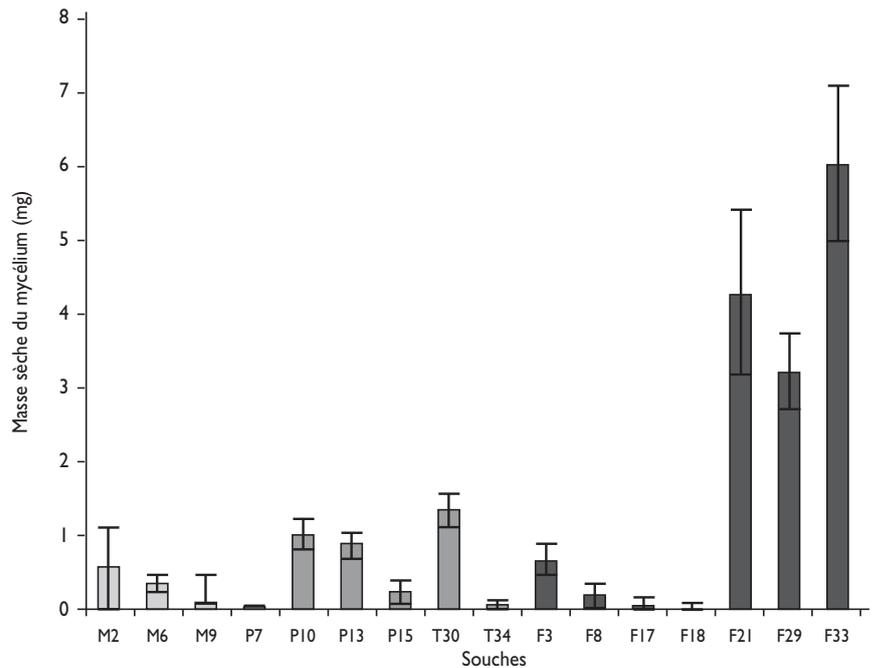


Fig. 1. Biomasse mycélienne des souches isolées après 27 jours de culture en milieu minéral additionné de benzo[a]pyrène (M : Mucor, P : Penicillium, T : Trichoderma, F : Fusarium).

tuée majoritairement de populations fongiques non ligninolytiques (tableau 1).

Étude de l'aptitude de ces isolats à croître en présence de BaP comme seule source de carbone

Ces souches présentent des aptitudes variables à croître en milieu minéral en présence de benzo[a]pyrène comme seule source de carbone. Introduites dans le milieu de culture sous forme de spores, la germination des champignons se produit rapidement à partir des réserves présentes dans les spores. Les souches potentiellement capables d'utiliser le benzo[a]pyrène pour leur métabolisme produisent ensuite une biomasse plus importante (fig. 1).

Cette première expérimentation nous a permis de sélectionner une souche F33, identifiée comme étant un isolat de *Fusarium solani* (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands) capable de produire une biomasse significative en présence de BaP comme seule source de carbone [5]. Pour valider le choix de cet isolat, une étude de la métabolisation de BaP radiomarqué a été réalisée.

ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA MINÉRALISATION DU BAP PAR *FUSARIUM SOLANI* EN FERMENTEUR

L'étude de la métabolisation du BaP, conduite en fermenteur en conditions cométaboliques, souligne l'aptitude du *Fusarium solani* à minéraliser rapidement cette

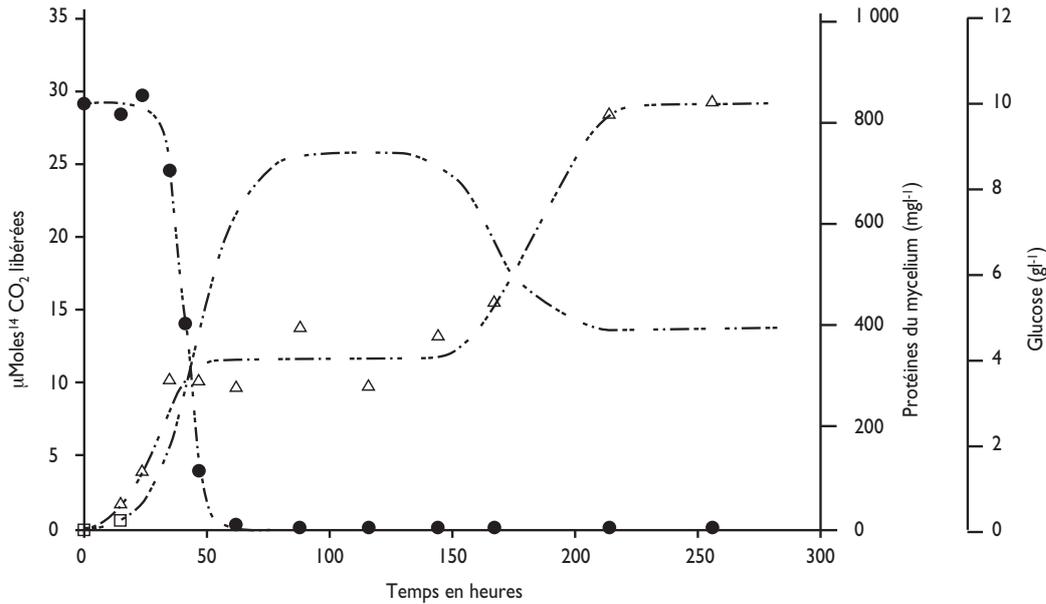


Fig. 2. Cinétique de croissance de *Fusarium solani* F33 en fermenteur contenant 1,6 l de milieu minéral additionné de 302 mg de [7,10-¹⁴C]benzo[a]pyrene. Symboles : Δ , ¹⁴CO₂ libéré, \square , protéines du mycélium, \bullet , concentration en glucose.

molécule (fig. 2). Dans les conditions de culture retenues, la souche présente une courbe de croissance et de consommation du glucose classique. La minéralisation du BaP se produit selon une courbe bimodale correspondant d'une part à la phase exponentielle de croissance et à la phase de déclin du champignon [6]. Le taux moyen de minéralisation du BaP obtenu (environ 65 μg/g biomasse/jour) est comparable aux taux obtenus avec les champignons de la pourriture blanche, champignons très étudiés en bioremédiation [7].

En fin de fermentation, le bilan carboné du [14C]BaP indique que 1,2 % du BaP est libéré sous forme de ¹⁴CO₂, 5,3 % est incorporé dans la biomasse, 0,5 % se retrouve dans la phase aqueuse et 85 % est détecté dans l'extrait dichlorométhane/acétate d'éthyle. Le taux non négligeable de radioactivité retrouvé dans la biomasse semble indiquer que ce champignon utilise le BaP comme source de carbone.

Parallèlement, nous avons mené une étude en microscopie à fluorescence qui souligne la présence de petites vésicules, sites d'une forte fluorescence liée à l'incorporation du BaP ou de l'un de ses métabolites, localisées dans le mycélium du champignon. D'après la littérature, les champignons métabolisent les HAP grâce à deux voies d'oxydation [8] (fig. 3). Le premier mécanisme fait intervenir des systèmes enzymatiques extracellulaires (de type Lignines Peroxydases [LiP], Peroxydases Manganèse-dépendantes [MnP] et Laccases) mis en œuvre chez les champignons ligninolytiques (White Rot Fungi ou champignons de la pourriture blanche). Le second mécanisme met en

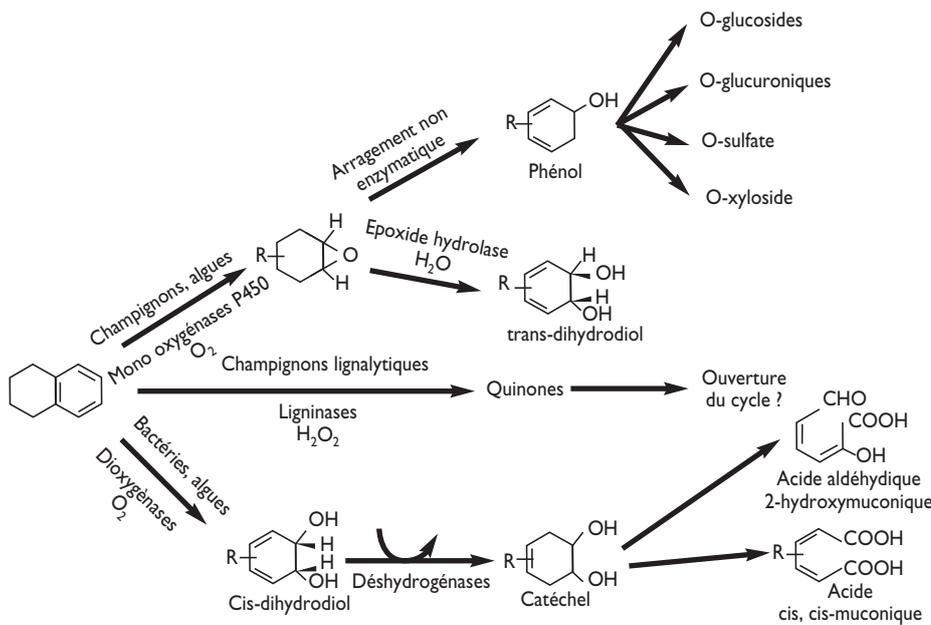


Fig. 3. Voies métaboliques microbiennes de dégradation des HAP.

œuvre un complexe multienzymatique intracellulaire à cytochrome P450.

La localisation intracellulaire du BaP dans les hyphes de *Fusarium solani* semblerait indiquer plutôt l'implication d'un système enzymatique de type cytochrome P450, qui sont des hémoprotéines localisées dans le réticulum endoplasmique. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la minéralisation du BaP en présence d'un inhibiteur spécifique des cytochromes P450, le 1-aminobenzotriazole (fig. 4).

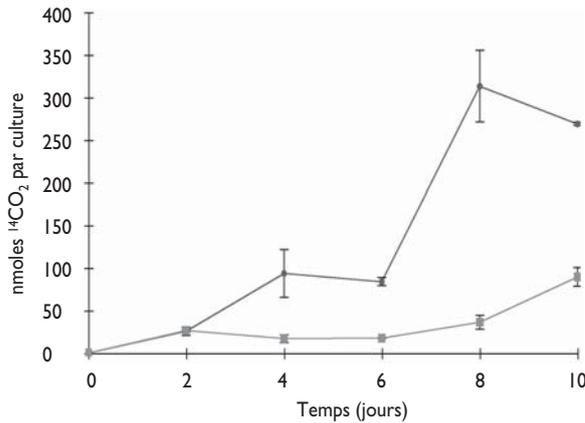


Fig. 4. Evolution du ¹⁴CO₂ libéré à partir de [7,10-¹⁴C]benzo[a]pyrène après 10 jours d'incubation d'une culture de *Fusarium solani* en milieu minéral. Symboles : ●, témoin sans inhibiteur ; ■, en présence du 1-aminobenzotriazole ajouté après 48 heures d'incubation.

D'après la figure 4, la diminution de la quantité de ¹⁴CO₂ semble confirmer l'implication d'une enzyme, contenant un hème dans son cycle catalytique, qui pourrait appartenir à la famille des cytochromes P450 compte tenu de

la nature de l'inhibiteur utilisé [5]. L'ensemble de ces résultats montre une nouvelle potentialité pour la dégradation du BaP d'une souche de *Fusarium solani*, ce qui, dans l'état actuel de nos connaissances, n'a jamais été décrit.

RECHERCHE ET IDENTIFICATION DES MÉTABOLITES DU BAP

De plus, en fin de fermentation, nous avons pu obtenir des quantités suffisantes de métabolites permettant leur identification. Deux principaux métabolites ont été identifiés comme étant la 1,6-benzo[a]pyrène quinone et la 3,6-benzo[a]pyrène quinone (fig. 5).

Bien que ces deux métabolites aient déjà été décrits comme produits de métabolisation du BaP par des champignons utilisant les cytochromes P450, l'originalité de ce résultat réside dans le fait que cette métabolisation ne s'accompagne pas de la production de composés polaires (tels que les dihydrodiols) caractéristiques de l'action d'une monooxygénase à P450 [9]. Néanmoins, ce résultat n'exclut pas l'implication d'un cytochrome P450 mais indiquerait un mode de fonctionnement radicalaire dans la dégradation du benzo[a]pyrène [10].

CONCLUSION

Bien que la bioremédiation soit considérée comme une alternative prometteuse pour la réhabilitation des sols pollués, la réussite d'une telle stratégie est souvent freinée par les capacités limitées des microorganismes à dégrader les HAP de haut poids moléculaire. Dans le cadre de ces travaux, nous avons sélectionné à partir de sols pollués un isolat de *Fusarium solani* capable de dégrader, en culture liquide, le benzo[a]pyrène, HAP de haut poids moléculaire. D'autres études conduites en présence de BaP marqué nous ont également permis de mettre en évidence l'aptitude de cette souche à minéra-

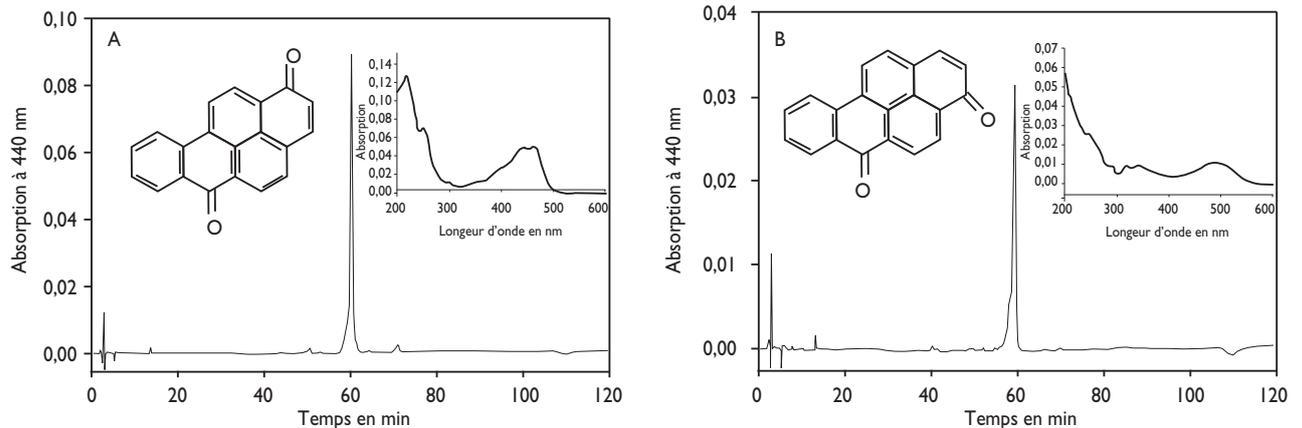


Fig. 5. Profils d'élution d'HPLC, spectres d'absorption UV et structures chimiques des métabolites de benzo[a]pyrène produits par *Fusarium solani*. (A) Métabolite I, 1,6-benzo[a]pyrène quinone ; (B) Métabolite II, 3,6-benzo[a]pyrène quinone.

liser le [7,10-¹⁴C]benzo[a]pyrène avec des taux moyens de minéralisation comparables aux taux obtenus avec les champignons de la pourriture blanche, champignons très étudiés en bioremédiation. De plus, outre son avantage d'être d'origine tellurique, ce champignon présente une certaine capacité à mobiliser et à incorporer le BaP qui est une molécule connue pour être peu biodisponible. Enfin, l'étude de la métabolisation du BaP par *Fusarium solani* a permis d'identifier dans un premier temps deux métabolites appartenant à la famille des benzo[a]pyrene-quinones. Ces métabolites présentent l'intérêt d'être des composés beaucoup moins polaires que les produits de dégradation du BaP habituellement obtenus par l'action de systèmes enzymatiques de type P450. Dans une perspective de développement de protocole de bioremédiation, différents axes de recherche doivent nous conduire à optimiser les conditions de dégradation des HAP par voie fongique et à compléter nos connaissances sur les voies métaboliques de cet isolat de *Fusarium solani*, en particulier via la caractérisation de nouveaux métabolites du BaP.

Catherine Rafin*, **Etienne Veignie***, **Patrice Woisel****, **Fabrice Cazier*****

*Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), 50, rue Ferdinand Buisson, BP 699, 62228 Calais Cedex

**ULCO, Laboratoire de Synthèse Organique et Environnement, MREID, 145, Avenue Maurice Schumann, 59140 Dunkerque

***ULCO, Centre Commun de Mesure, MREID, 59140 Dunkerque

Références

- [1] Sims, J. L., Sims, R. C., Matthews, J. E. 1990. *Approach to remediation of contaminated soil*. Haz. Waste Haz. Mater. 7, 117-148.
- [2] Cerniglia, C. E. 1992. *Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Biodegrad. 3, 351-368.
- [3] Juhasz, A. L., Naidu, R. 2000. *Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene*. Int. Biodet. Biodegrad. 45, 57-88.
- [4] Bennett, J. W. and Faison, B. D. 1997. *Use of fungi in biodegradation*. In Hurst, C. J., Knudsen, G. R., McInerney, M. J., Stetzenbach, L. D., Walter M. V. (editors). *Manual of Environmental Microbiology*, ASM Press, Washington, pp. 758-765.
- [5] Rafin, C., Potin, O., Veignie, E., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Sancholle, M. 2000. *Degradation of benzo[a]pyrene as sole carbon source by a non white rot fungus, Fusarium solani*. Polycycl. Arom. Compds. 21, 311-329.
- [6] Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P., Lounes-Hadj Sahraoui, A., Cazier, F. 2002. *Metabolization of the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus (Fusarium solani) in batch reactor*. Polycycl. Arom. Compds. 22, 87-97.
- [7] Sanglard, D., Leisola, M. S. A. and Fiechter, A. 1986. *Role of extracellular ligninases in biodegradation of benzo[a]pyrene by Phanerochaete Enzyme Microb. Technol. 8, 209-212.*
- [8] Augustin, J., Muncnerova, D. 1994. *Degradation pathways of aromatic hydrocarbons in fungi and bacteria*. Biologia 49, 289-299.
- [9] Cerniglia, C. E. and Gibson, D. T. 1979. *Oxidation of benzo[a]pyrene by the filamentous fungus Cunninghamella elegans*. J. Biol. Chem. 254, 12174-12180.
- [10] Cavaliere, E. L., Rogan, E. G. 1995. *Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Xenobiotica 25, 677-688.

WWW.
pro-environnement.com

Information et documentation pour les professionnels de l'environnement

1600 formations à l'environnement
accès gratuit aux deux bases de données

Base de données de l'éco-industrie
enregistrement et accès gratuit

Archives éditoriales du mensuel Environnement & Technique
accès gratuit pour la recherche d'articles

Archives éditoriales du trimestriel Déchets Sciences & Techniques
accès gratuit pour la recherche d'articles

Archives éditoriales de la lettre Info Santé Déchets
accès gratuit pour la recherche d'articles