

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES**

ET

**UNIVERSITÉ CONCORDIA
SCHOOL FOR BUILDING
PROGRAMME DE GÉNIE CIVIL**

**APPROCHE MICROBIOLOGIQUE DE L'ÉTUDE DE
L'EFFICACITÉ D'UN COUVERT LIGNEUX
DANS LA RESTAURATION DU PARC DE
RÉSIDUS EAST SULLIVAN**

DE

JOSEPH HOGAN

REMIS À

JOHANNE CYR

CLAUDE DUFOUR

**Ministère des Ressources Naturelles
Service du développement minier
5700, 4e Avenue Ouest - A.213
Charlesbourg, QC G1H 6R1**

FÉVRIER 1998

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
DÉPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES**

ET

**UNIVERSITÉ CONCORDIA
SCHOOL FOR BUILDING
PROGRAMME DE GÉNIE CIVIL**

**APPROCHE MICROBIOLOGIQUE DE L'ÉTUDE DE
L'EFFICACITÉ D'UN COUVERT LIGNEUX
DANS LA RESTAURATION DU PARC DE
RÉSIDUS EAST SULLIVAN**

DE

JOSEPH HOGAN

REMIS À

JOHANNE CYR

CLAUDE DUFOUR

**Ministère des Ressources Naturelles
Service du développement minier
5700, 4e Avenue Ouest - A.213
Charlesbourg, QC G1H 6R1**

FÉVRIER 1998

TABLE DE MATIÈRES

no. page

	Table de matière	i
	Liste des tableaux, figures et appendices	iii
	Résumé	1
	Introduction	2
1	LA DÉGRADATION MICROBIENNE DE LA MATIÈRE VÉGÉTALE.	3
1.1	<u>Caractérisation des résidus ligneux</u>	3
1.2	<u>La dégradation de la matière ligneuses</u>	3
1.2.1	Le processus de dégradation de la cellulose	4
1.2.1.1	Les étapes enzymatiques de la dégradation de la cellulose par les moisissures (champignons).	4
1.2.2	Processus de dégradation de l'hémicellulose.	5
1.2.2.1	Systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation du xylane	6
1.2.2.2	Dégradation enzymatique du galactomannane	7
1.2.3	Processus de dégradation de la lignine	7
1.3	<u>Produits résultant du métabolisme des champignons et pouvant montrer des effets inhibiteurs sur la croissance de d'autres microorganismes</u>	10
1.4	<u>Rôle des bactéries dans la dégradation de la matière végétale</u>	11
1.5	<u>Les levures et la dégradation de la matière végétale</u>	13
1.6	<u>Le cycle du soufre.</u>	13
2	PRÉLEVEMENT DES ÉCHANTILLONS SUR LE TERRAIN	15
2.1	<u>Conditions environnementales</u>	15
2.2	<u>La stratification de la couverture végétale et des résidus miniers</u>	16
2.3	<u>Les microorganismes trouvés dans chaque zone</u>	17
2.3.1	RF1 <u>Niveau exposé à la lumière</u>	17
2.3.2	RF2 <u>Zone aérobie</u>	18
2.3.3	RF3 <u>Zone transitoire</u>	18
2.3.4	RF4 <u>Zone anaérobie</u>	18
2.3.5	RM1 <u>Zone de lixiviation anaérobique</u>	19
2.3.6	L1 <u>Zone de drainage</u>	19
2.3.7	L2 <u>Zone d'eaux interstitielles des résidus forestiers</u>	19
2.3.8	L3 <u>Zone d'eaux interstitielles des résidus miniers</u>	20
2.4	<u>Le protocole de prélèvement</u>	20
2.4.1	<u>L'échantillonnage</u>	20
2.4.2	<u>Le prélèvement et le transport des échantillons</u>	22
3	MÉTHODES D'IDENTIFICATION MICROBIENNE	23
3.1	<u>Evaluation des conditions environnementales et prise d'échantillon</u>	23
3.2	<u>Préparation et conservation des échantillons</u>	23
3.3	<u>Evaluation de la masse microbienne viable et sa diversité</u>	23
3.3.1	Le test du nombre le plus probable(NPP)	23
3.3.2	Tests morphologiques	24
3.3.2.1	Coloration de Gram	24
3.3.2.2	Microscopie à contraste de phase	24
3.3.2.3	Coloration à l'acridine orange	24
3.4	<u>Tests métaboliques généraux et spécifiques</u>	25
3.4.1	Le test MTT(Promega, Madison WI)	25
3.4.2	Cellulolyse aérobie et anaérobique	25

3.4.3	Hémi-cellulolyse aérobie et anaérobie	26
3.4.4	Réduction des sulfates	26
3.5	<u>Isolement des Microorganismes</u>	26
3.5.1	Isolement et identification des champignons et moisissures	26
3.5.2	Isolement et identification des actinomycètes	27
3.5.3	Isolement et identification des bactéries	27
3.5.4	Isolement et identification des levures	27
3.6	<u>Méthodes moléculaires d'identification bactérienne</u>	28
3.6.1	Identification bactérienne par hybridation à l'aide de sondes d'ADN	28
3.6.2	Identification des bactéries lithotrophes à l'aide d'anticorps spécifiques	29
	3.6.2.1 Immunofluorescence	29
	3.6.2.2 ELISA	29
3.7	<u>Evaluation de l'efficacité de la recirculation des lixiviats sur le couvert végétal</u>	30
	Conclusion	31
	Bibliographie	33
	Annexe 1 - Classification des organismes en fonction de leur métabolisme aérobie ou anaérobie	39
	Annexe 2 - Microorganismes qui peuvent dégrader la cellulose, l'hémicellulose et la lignine	40
	Annexe 3 - Sensibilité au pH des microorganismes	41
	Annexe 4 - Organismes qui peuvent dégrader le soufre et le fer	42
	Annexe 5 - Sensibilité à la température des microorganismes	43

LISTE DES TABLEAUX, FIGURES ET ANNEXES

LISTE DES TABLEAUX		no. page
Tableau 1	Pourcentages de cellulose, d'hémicellulose et de lignine dans les essences utilisées au site East Sullivan.	3
Tableau 2	Liste des enzymes pouvant agir comme producteurs d'H ₂ O ₂	10
Tableau 3	Métabolites provenant de la dégradation de la lignine	10
Tableau 4	Métabolites toxiques produits par la métabolisme des champignons	11
Tableau 5	Les précipitations mensuelles au site East Sullivan	15
Tableau 6	Stratification de la couverture végétale	16

LISTE DES FIGURES

Figure 1	L'orientation d'un lien α	4
Figure 2	L'orientation d'un lien β	4
Figure 3	Représentation tridimensionnelle de la cellulose	5
Figure 4	Structure des hémicelluloses du bois dur et du bois mou	6
Figure 5	Les trois précurseurs principaux de la lignine	8
Figure 6	La diversité des liaisons dans la lignine	9
Figure 7	Processus de dégradation de la lignine	12
Figure 8	Le zonage présumé de la couverture	17
Figure 9	Les endroits de prélèvement des échantillons - East Sullivan	21
Figure 10	Processus des méthodes d'immunofluorescence directe et indirecte	29

ANNEXES

		no. page
Annexe 1	Classification des microorganismes en fonction de leur métabolisme aérobie ou anaérobie	39
Annexe 2	Microorganismes qui peuvent dégrader la cellulose, l'hémi-cellulose et la lignine	40
Annexe 3	Sensibilité au pH des microorganismes	41
Annexe 4	Microorganismes qui peuvent dégrader le soufre et le fer	42
Annexe 5	Sensibilité à la température des microorganismes	43

RÉSUMÉ

Le plan de restauration du parc à résidus miniers East Sullivan a été conçu dans le but de minimiser l'impact environnemental des résidus acides miniers drainés par les eaux pluviales et de fonte. Ce plan comportait quatre étapes par lesquelles il était possible de contrôler l'acidité et les résidus toxiques des eaux de drainage miniers via l'addition d'un couvert ligneux suivie d'une récupération des eaux de drainage, et par la construction de digues étanches et de leurs traitements via des processus biologiques.

Au cours de ce travail, nous allons analyser les processus microbiens de dégradation de la matière végétale du couvert ligneux sous la gouverne des champignons, moisissures, levures, actinomycètes et bactéries en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose et ce, en relation avec les bactéries impliquées dans le cycle du soufre. La flore microbienne dans les résidus ligneux et les résidus miniers se développe en fonction des éléments énergétiques disponibles à partir de la matière végétale et des minéraux. Dans les résidus forestiers, une variété de produits peuvent servir de source d'énergie, dont les plus communs sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Par contre, les proportions entre ces trois substances varient selon les essences végétales utilisées.

Une seconde section sera consacrée aux méthodologies d'échantillonnage pertinentes. Un échantillonnage adéquat joue un rôle très important dans l'évaluation des processus microbiologiques d'un site. La complexité des conditions environnementales influence la diversité des microorganismes. Parmi les facteurs les plus importants, on peut compter le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la température et l'humidité.

Dans un troisième temps, une approche expérimentale en plusieurs éléments sera proposée afin de déterminer l'activité microbienne dans chacun des sites d'échantillonnage et la nature des microorganismes présents afin d'évaluer les déséquilibres de la flore microbienne après la recirculation des lixiviats sur le couvert ligneux. La première étape consiste en l'évaluation de la masse microbienne viable et sa diversité, la deuxième se réfère à la vérification des capacités métaboliques vis-à-vis les résidus ligneux et finalement, il est nécessaire d'identifier plus spécifiquement les microorganismes, qui se sont les mieux adaptés aux conditions particulières de ces résidus ligneux, et leurs capacités métaboliques vis-à-vis les objectifs désirés. Fort de ces résultats, il sera alors possible de vérifier les effets de la recirculation des eaux acides sur l'équilibre microbien présent dans les résidus de bois.

INTRODUCTION

Le plan de restauration du parc à résidus miniers East Sullivan a été conçu dans le but de minimiser l'impact environnemental des résidus acides miniers drainés par les eaux pluviales et de fonte. Ce plan comportait 4 étapes par lesquelles il était possible de contrôler l'acidité et les résidus toxiques des eaux de drainage miniers via l'addition d'un couvert ligneux suivi d'une récupération des eaux de drainage, et par la construction de digues étanches et de leurs traitements via des processus biologiques.

Dans un telle situation une succession de communautés microbiennes peut graduellement s'établir dans le couvert ligneux et dans les différents zones de traitement des eaux en fonction des conditions physico-chimiques et des différents types de substrats organiques et inorganiques qui y prévalent comme éléments nutritifs ou toxiques. Les interactions et les successions microbiennes qui peuvent se produire dépendent fortement de la présence ou de l'absence d'oxygène. En présence d'oxygène, de nitrates, d'ions ferriques et de sulfates, une séquence d'utilisation des oxydants est prévisible de telle manière que les microorganismes réducteurs de sulfates soient inhibés ou tués. Les actions microbiennes qui catalysent la production d'eaux de drainage acide débutent habituellement par de l'auto-oxydation et par l'action oxydante de *Thiobacillus thiooxidans* sur la pyrite en générant du sulfate et des ions hydrogène. *T. ferrooxidans* transforme alors le fer ferreux en ions solubles ferriques qui peuvent subséquemment oxyder des sulfides ou des minéraux, solubilisant ainsi une variété d'ions métalliques, ainsi que des ions Fe^{2+} et du soufre élémentaire qui sera alors transformé en acide sulfurique. Par contre, lors de l'épuisement de l'oxygène disponible ou en condition d'anaérobiose, une compétition apparaît avec d'autres oxydants, telles les formes oxydées du manganèse et de fer avant l'action des réducteurs de sulfates telles les bactéries *Desulfovibrio* ou *Desulfomonas*.

Au cours de ce travail, nous allons analyser les processus microbiens de dégradation de la matière végétale sous la gouverne des champignons, moisissures, levures, actinomycètes et bactéries en conditions d'aérobiose et d'anaérobiose et ce, en relation avec les bactéries impliquées dans le cycle du soufre. Une seconde section sera consacrée aux méthodologies d'échantillonnage pertinentes. Dans un troisième temps, une approche expérimentale en plusieurs éléments sera proposée afin de déterminer l'activité microbienne dans chacun des sites d'échantillonnage et la nature des microorganismes présents afin d'évaluer les déséquilibres de la flore microbienne après la recirculation des lixiviats sur le couvert ligneux.

1 LA DÉGRADATION MICROBIENNE DE LA MATIÈRE VÉGÉTALE.

1.1 Caractérisation des résidus ligneux

La flore microbienne dans les résidus ligneux se développe en rapport avec les éléments énergétiques disponibles à partir de la matière végétale. Dans les résidus forestiers, une variété de produits peut servir de source d'énergie. Les plus communs sont la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Les rapports entre ces trois produits varient selon l'essence végétale. Dans les résidus forestiers sur le site East Sullivan, on y trouve les espèces suivantes: l'épinette noire et le tremble 53-54

Tableau 1: Pourcentages de cellulose, d'hémicellulose et de lignine dans les essences utilisées au site East Sullivan.

Nature des composés	Épinette noire (Picea mariana) ¹	Tremble (Populus tremuloides) ²
	(bois mou)%	(bois dur)%
cellulose	43	53
hémicellulose	30	31
lignine	27	16

1-Rowell, 1984, 2- Mullins et McKnight, 1981

Selon le tableau 1, la cellulose est le composé le plus important, suivi de l'hémicellulose alors que la lignine, difficile à dégrader, est en plus forte concentration dans l'épinette noire que dans le tremble.

1.2 La dégradation de la matière ligneuse

La flore microbienne peut dégrader la matière végétale de différentes manières dépendant de la présence ou de l'absence d'oxygène c-à-d. en situation d'aérobiose ou d'anaérobiose (voir annexe 1).

Les processus de la dégradation végétale sont principalement axés sur les substances primaires du bois, c-à-d. la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Chacune de ses substances possède des propriétés spécifiques et les mécanismes enzymatiques responsables de leur dégradation peuvent varier selon les microorganismes impliqués et les conditions environnementales.

Les principaux microorganismes impliqués dans la dégradation aérobie du bois sont les moisissures, les actinomycètes et les bactéries (voir annexes 1 et 2). Certains types de

microorganismes sont spécifiquement impliqués dans la dégradation de la matière végétale alors que d'autres agissent comme support des premiers. Les moisissures à pourriture blanche sont les microorganismes les plus efficaces dans cette dégradation, ce qui n'exclut pas le rôle important des moisissures à pourritures brune et douce. Les actinomycètes, quoique moins efficaces que les moisissures, dégradent de façon similaire la matière végétale.

1.2.1 Le processus de dégradation de la cellulose

La cellulose est un polymère composé d'un seul sucre, le glucose, en chaîne linéaire. Elle se compose de milliers d'unités de glucose liées entre elles par le même type de liaison, peu importe le nombre d'unités de glucose. La cellulose représente de 41 à 45% du poids du bois sec (Mullins & McKnight, 1981). Chaque glucose est lié au second en la position C1 du premier glucose à la position C4 du second via une liaison, dite β , correspondant à l'orientation du lien (Figures 1 et 2).

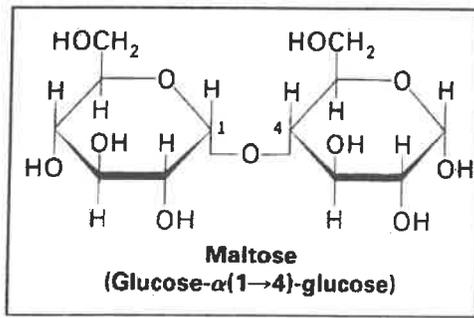


Figure 1. Cette image nous montre l'orientation d'un lien α (Stryer, 1988)

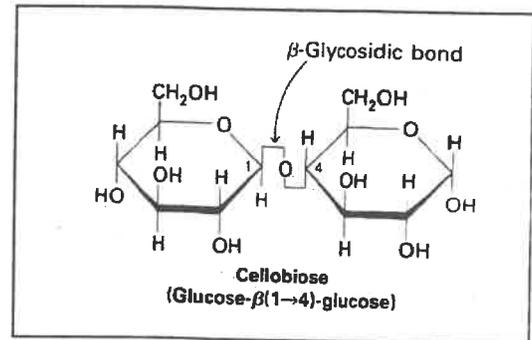
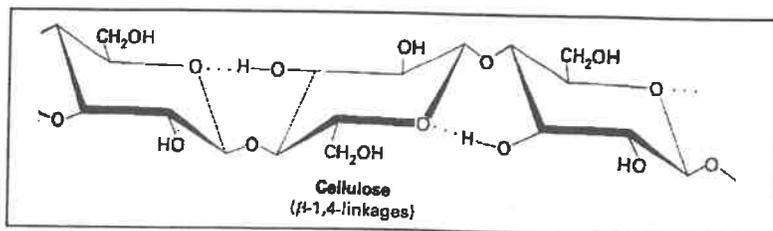


Figure 2. Cette image nous montre l'orientation d'un lien β , (Stryer, 1988)

1.2.1.1 Les étapes enzymatiques de la dégradation de la cellulose par les moisissures (champignons).

Plusieurs étapes enzymatiques sont nécessaires pour dégrader la cellulose. Ainsi, l'endo-1,4- β -D-glycosidase est une enzyme qui brise les liens entre deux glucoses en présence de molécules d'eau. L'enzyme repère les liens en position 1 et 4 à l'intérieur du polymère. L'action de cette enzyme entraîne la production d'oligosaccharides, qui sont des polymères de glucose plus courts que la cellulose, mais de longueurs variables. Ensuite, les exo-1,4- β -glucosidases (telles la cellobiohydrolase et d'autres exoglucosidases) enlèvent les unités de glucose du polymère, en présence de molécules d'eau, à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide, tel que montré dans figure 3. La cellobiose, qui est un disaccharide, donc à deux molécules de glucose, résulte de cette réaction. Finalement, les 1,4- β -glucosidases hydrolysent la cellobiose de façon à donner des glucoses libres.

Figure 3. Représentation tridimensionnelle de la cellulose. La cellulose est une chaîne de glucoses liés entre eux par un lien β . Cette figure nous montre une représentation en 3-D, pour mieux voir les liaisons β entre les molécules du glucose. (Stryer, 1988)



Lorsque la cellulose est mélangée à de la lignine, les cycles de dégradation de la cellulose et de la lignine se lient entre eux. La cellobiose-quinone oxydoréductase du cycle de dégradation de la lignine agirait sur la cellulose pour donner de la cellobiono- δ -lactone. La cellobiose, en présence de la cellobiose oxydase, se transforme en acide cellobionique qui se décompose, par l'action de la 1,4- β -glucosidase, en glucose et en gluconolactone. La gluconolactone, par contre, inhibe les 1,4- β -glucosidases, ce qui a pour conséquence d'arrêter la décomposition du cellobiose. Ce mécanisme de contrôle des moisissures leur permet de dégrader seulement la quantité de cellulose qu'elles peuvent utiliser (Zabel et Morrell, 1992). D'autre part, en présence d'un excès de cellobiose, une retransformation de cette substance en oligosaccharides via l'action des endogluconases peut s'opérer. Ce phénomène s'appelle la transglucosylation.

En conséquence, les sous-produits de la dégradation de la cellulose via des processus enzymatiques microbiens sont donc, le glucose, la cellobiose, le gluconolactone (qui peut agir comme inhibiteur en présence d'une forte concentration de glucose) et des oligomères de glucose. Ces produits peuvent donc servir de sources organiques d'énergie pour les microorganismes présents dans la matière végétale et dans l'environnement.

1.2.2 Processus de la dégradation d'hémicellulose

Les hémicelluloses sont des polysaccharides non-cellulosiques de la paroi cellulaire des cellules végétales (Mullins et McKnight, 1981). L'hémicellulose est composée de sucres simples, mais se différencie de la cellulose par la nature des sucres. Alors que la cellulose se compose exclusivement de glucose, l'hémicellulose contient du glucose, du galactose, du mannose, du xylose et de l'arabinose. La longueur de la chaîne d'hémicellulose peut varier entre 100 à 200 unités (Mullins et McKnight, 1981). L'hémicellulose principale des bois dur est le xylane alors que les bois mous contiennent du xylane et du galactoglucomannane (Mullins et McKnight 1981)(Figure 4). Ces deux types majeurs d'hémicellulose ont les mêmes fonctions mais sont dégradés par des voies métaboliques différentes. Les enzymes impliqués sont spécifiques à chaque type de liaison et ne sont pas tous produits par le même microorganisme. Les moisissures, indiquées dans le tableau en annexe 2, jouent un rôle dans la dégradation soit du xylane ou du galactomannane.

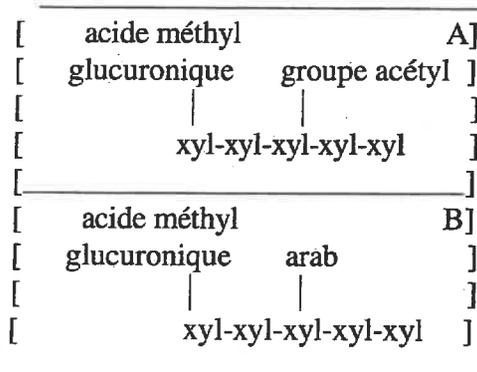


Figure 4: Structure de l'hémi-cellulose du bois dur(A) et du bois mou(B). (Mullins et McKnight, 1981).
xyl=xylose; arab=arabinose

1.2.2.1 Systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation du xylane

Comme indiqué précédemment, le xylane est présent autant dans les bois durs que dans les bois mous. Il s'agit d'un polymère fait d'une chaîne de monomères de β -D-xylose liés entre eux par un lien glycosidique 1 \rightarrow 4. L'élongation de la chaîne polysaccharidique se fait par l'addition de 4-O-méthyl- α -D-glucuronate lié à une unité de xylose (lien 1 \rightarrow 2). L'arabinose est liée à une unité de xylose par une liaison 1 \rightarrow 3. Les groupements O-acétyls sont liés au carbone 2 ou 3 du xylane et remplacent les groupements hydroxyles (Mullins and McKnight 1981).

Les endo-1,4- β -xylanases: Ces enzymes coupent le lien entre deux molécules de xylose dans la chaîne de xylane. Cette réaction produit des molécules de xylose de la même façon que l'action des β -glucosidases sur les fragments de cellulose.

Les 1,4- β -xylosidases: Ces enzymes hydrolysent les fragments résiduels de xylane ou les oligomères de cellulose.

Les α -glucuronidases: Ils séparent les chaînes latérales du 4-O-méthylglucurone, ce qui entraîne la production d'acide glucuronique utilisé comme élément nutritif par les moisissures.

Les α -arabinosidases - L'action des endoxylanases est améliorée par l'activité de ces enzymes qui enlèvent les chaînes de L-arabinose, car elles masquent leur action de par leur position moléculaire sur la chaîne de xylane.

Finalement, les acétyl-estérases enlèvent les groupements acétyls du xylane et du galactoglucomannane.

En conséquence, les sous-produits de la dégradation enzymatique du xylane sont le xylose, l'acide glucuronique, l'arabinose et des groupements acétyls fonctionnels.

1.2.2.2 Dégradation enzymatique du galactomannane

Le galactoglucomannane se rencontre dans les bois mous et consiste en une chaîne de monomères de mannoses et de glucoses liés entre eux pour former une chaîne polysaccharidique semblable à celle de la cellulose (Mullins et McKnight, 1981). Le rapport glucose/mannose dans cette chaîne est de 1:3. Les chaînes latérales se composent d'un galactose et de groupes fonctionnels O-acétyls pour chaque unité saccharidique de la chaîne.

La décomposition des mannanes nécessitent plusieurs enzymes (Zabel et Morrell, 1992). Leur modes d'action sont semblables à ceux impliqués dans la décomposition du xylane.

Les endo-1,4- β -mannanases - Ces enzymes brisent le lien entre les deux molécules de mannose de la chaîne polysaccharidique similairement à l'action des endoglucanases sur la cellulose, ce qui génère des molécules de mannoses et des oligomères de mannose .

Les β -mannosidases: Elles hydrolysent les fragments de mannane ou les oligomères de mannose.

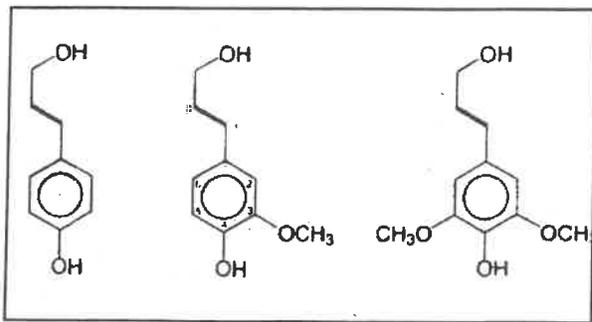
Les β -glucosidases: Ces enzymes séparent les molécules de glucose de la chaîne de mannane. Ce glucose est alors utilisé comme élément nutritif pour les moisissures.

Les α -galactosidases: Afin de rendre les endoxylanases plus efficaces, les β -galactosidases enlèvent les chaînes de galactose qui masquent les sites d'action sur la chaîne de la mannane.

Les acétyl-estérases: Finalement, ces enzymes enlèvent les groupements acétyls de la chaîne de mannane résiduelle. La dégradation enzymatique du galactomannane entraîne donc la production de mannose, de glucose et de groupements acétyls fonctionnels.

1.2.3 Processus de dégradation de la lignine

Des trois molécules majeures composant le bois, la lignine est la moins soluble. Elle ne se compose pas d'une chaîne répétitive de sucres simples, ce qui la rend plus difficile à dégrader par les microorganismes. Elle origine plutôt de trois précurseurs qui sont l'alcool p-coumaryl, l'alcool p-coniferyl et l'alcool p-sinapyl (figure 5). Ces précurseurs subissent plusieurs transformations ce qui entraîne un grand nombre de liaisons différentes nécessitant plusieurs étapes enzymatiques pour sa dégradation (figure 6)(Reid, 1995 et Mullins et McKnight, 1981).



A) Alcool p-Coumaryl

B) Alcool p-Coniferyl

C) Alcool p-Sinapyl

Figure 5. Les trois précurseurs principaux de la lignine (Ried, 1995; Zabel et Morrell, 1992)

A

B

C

La dégradation de la lignine est plutôt sous la gouverne d'enzymes ayant une activité peu spécifique, c-à-d. qu'ils agissent en initiant une réaction oxydante sur laquelle l'enzyme n'a pas de contrôle.

La lignine peroxidase: Cet enzyme, anciennement nommé lignase, agit de façon non-spécifique sur plusieurs molécules, dont la lignine, en association avec un co-facteur, le peroxyde d'hydrogène, H₂O₂(Kirk, 1988). Un grand nombre de champignons à pourriture blanche utilise cet enzyme. La lignine peroxidase oxyde les anneaux aromatiques méthyloxydés sans groupement libre de phénol. Il peut dégrader les unités de lignine avec ou sans groupements phénoliques (Kirk, 1988).

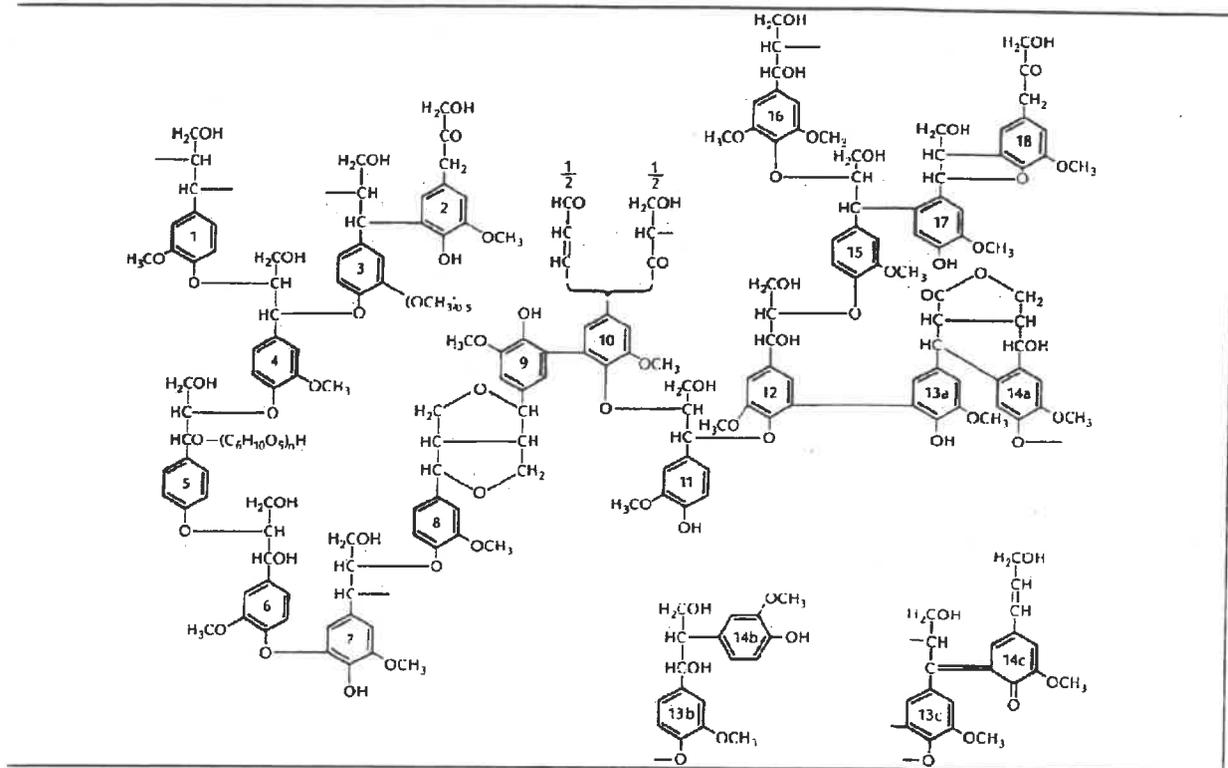


Figure 6. La diversité des liaisons dans la lignine (Mullins et McKnight 1981)

La manganèse peroxidase Cet enzyme utilise le manganèse (MnII) comme substrat de réduction en association avec le H_2O_2 (Kirk, 1988). Cette réaction, en présence d'un acide organique, donne un complexe capable d'oxyder des molécules, telles que la lignine. Le Mn(III) oxyde alors les phénols avec des radicaux phénoxyliques. Cet enzyme ne peut alors dégrader que les unités de lignines possédant des groupements phénoliques (Kirk, 1988).

La laccase : Ce troisième enzyme contient du cuivre(Cu) et agit en association avec l' O_2 comme co-facteur. Il oxyde les molécules de lignine contenant des groupements phénoliques (Kirk, 1988).

La cellobiose:quinone oxydoréductase (CBQase)(Reid, 1995) - La CBQase attaque et solubilise le cellobiose en molécules de glucose. Comme la cellulose est un produit de dégradation autant de la cellulose que de la lignine, cette substance pourra être produite simultanément au cours des deux cycles enzymatiques. La lignocellulose est donc une expression reflétant cette interaction entre les deux cycles.

Les enzymes producteurs d' H_2O_2 : Comme les enzymes pré-cités nécessitent du H_2O_2 comme co-facteur, plusieurs enzymes ont le potentiel de générer ce produit.

**Tableau 2: Liste des enzymes pouvant agir
comme producteurs d'H₂O₂**

glucose-1-oxydase
glucose-2-oxydase
glyoxol oxydase
aryl alcool oxydase
méthanol oxydase

La production de ces enzymes par les microorganismes est dépendante de la présence de sucres qui pourraient alors provenir de la solubilisation de la cellulose, de l'hémicellulose ou de la lignine (Reid, 1995). Ces enzymes agissent par la réduction de l'O₂ sous forme de H₂O₂ (Kirk, 1988).

La dégradation de la lignine favorise la production de plusieurs métabolites tels qu'indiqués dans le tableau 3.

1.3 Produits résultant du métabolisme des champignons et pouvant montrer des effets inhibiteurs sur la croissance d'autres microorganismes

La dégradation de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine par les moisissures de la pourriture du bois (voir annexe 2) entraîne la production de plusieurs métabolites qui peuvent servir d'éléments nutritifs pour les autres microorganismes de l'écosystème mais aussi peuvent créer des conditions défavorables pour la croissance d'autres champignons ou de bactéries (Tableau 4).

Il a été montré que certaines espèces de champignons produisaient des substances chimiques capables d'inhiber la croissance d'un compétiteur (Chakravarty 1995; Trifonov 1995). Par exemple, *Stachbotrys cylindrospora* rejette des produits chimiques défavorables à la croissance de *Ophiostoma piliferum* et *O. crassivaginatam*. Aussi, le champignon *Peniophora polygomia* inhibe la croissance de *Phellinus tremulae*. L'activité de ces inhibiteurs est dépendante de leur concentration et, en présence de plusieurs types de microorganismes, la concentration effective risque de ne pas être suffisante pour inhiber la croissance du compétiteur. Le tableau 4 montre une liste de métabolites dérivant de la dégradation de la lignine par des champignons et capables d'une activité inhibitrice (Reid, 1995; Chakravarty, 1995; Schubert, 1965; Trifonov, 1995; Trifonov, et al.1992; Zabel et Morrell, 1992):

Tableau 3: Métabolites provenant de la dégradation de la lignine

Acétosyringone	Coniféraldéhyde	Guaiacylglycérol-β-coniféryl
Acide isovanillique	Syringaldéhyde	Acide syringique
Vanille	Acide vanillinique	Acide vératrique
Acide 3-méthoxy-4-hydroxyphénylpyruvique		

Tableau 4: Métabolites toxiques produits par le métabolisme des champignons

Acide anthranilique	Alcools aryliques	Benzaldéhyde
Acide benzoïque	Ethonals	Glyoxol
Alcool isoamylique	Isobutanol	Alcool isobutylique
Acide isobutyrique	Acide isobutyrique	Acide isovalérique
Maltose	Méthanol	Acide phénylacétique
Acide p-Hydroxy benzoïque	Sodium isobutyrate	Sodium isovalérate
Acide Sodium 2-Méthyl butyrique		Sodium phényl acétate
Acide tiglique	Acide 2-Méthyl butanoïque	2-méthylbutanol
2-Phényléthanol	3-Phénylpropanol	

1.4 Rôle des bactéries dans la dégradation de la matière végétale

Parmi les bactéries capables de croître dans la matière végétale, deux types peuvent être observés: celles qui peuvent directement dégrader les substances végétales et celles qui ne le peuvent pas. Les voies métaboliques utilisées par les bactéries sont moins connues que celles décrites pour les champignons-moisissures.

Plusieurs genres sont connus pour dégrader le bois dont: *Streptomyces* et *Clostridium*. Certaines espèces bactériennes appartenant à ces genres sont celles qui sont le plus souvent citées dans la dégradation de la cellulose, de l'hémicellulose ou de la lignine (voir annexe 1). La dégradation du bois par les actinomycètes ne constitue pas la source majeure d'énergie ou de carbone pour ces microorganismes. Il faut noter que le genre *Clostridium* diffère des autres bactéries par son métabolisme strictement anaérobique.

Godden et al.(1992) ont étudié ces processus de dégradation par les actinomycètes (*ie. Streptomyces*) du bois et ont pu identifier certaines étapes métaboliques quoique le processus ne soit pas encore complètement élucidé. La dégradation de la lignine implique la production d'enzymes tels la peroxydase, une déméthylase, une préotocatéchuatase et la β -carboxymuconate décarboxylase (Godden et al.,1992).

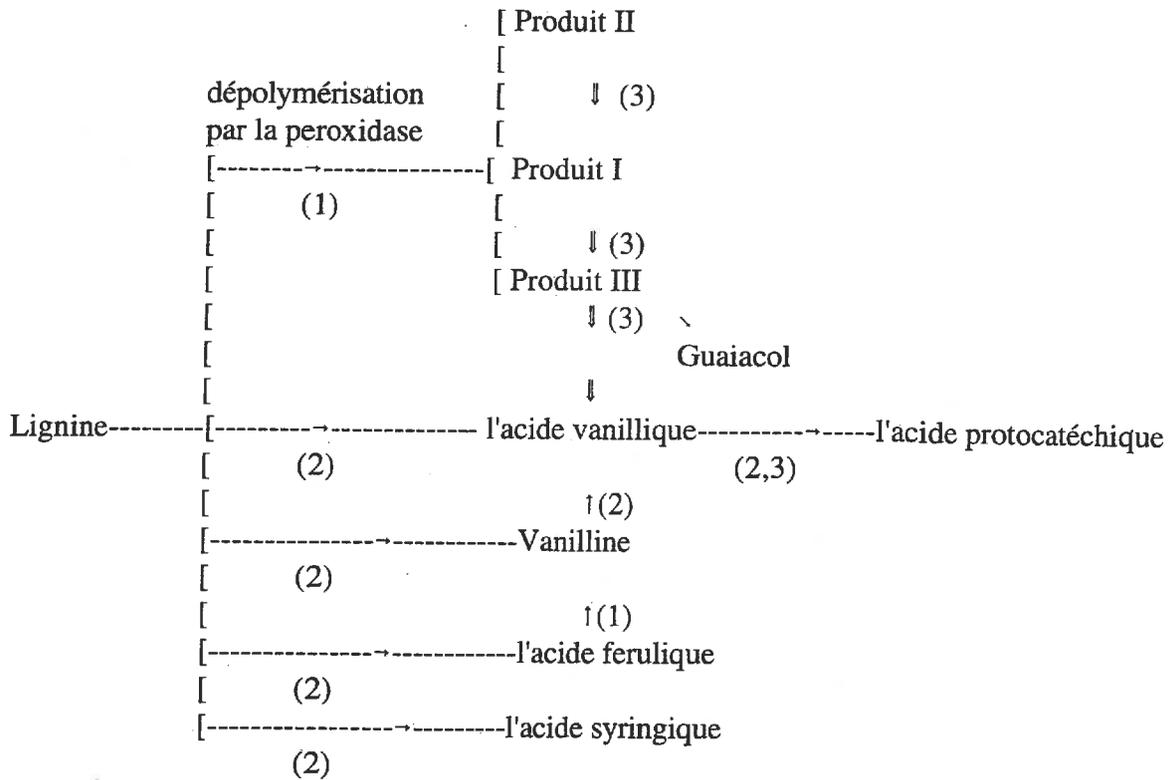
Alors que la dégradation de la cellulose est dominée par les populations de champignons dans les conditions humides, les bactéries cellulolytiques sont plus importantes dans les résidus semi-arides.

Un pH d'environ 5.7 à 6.2 favorise la croissance des bactéries alors qu'en bas de 5.5, les moisissures sont plus impliquées dans la dégradation de cellulose (voir annexe 3). En condition aérobie, les populations bactériennes dites facultatives ou aérobiques (voir annexe 1) prédominent alors que *Clostridium* demeure le plus important fermenteur de cellulose en condition d'anaérobiose et entraîne la production d'acides gras de faible poids moléculaire aussi bien que du CO₂ de l'eau et de la matière organique sous la forme de biomasse microbienne. À haute température, des bactéries thermophiles cellulolytiques, telle le *Clostridium thermocellum*, peuvent permettre la dégradation de

la cellulose.

D'autre part, les différents composés de l'hémicellulose tels que le xylane, le mannose et le galactomannane, peuvent être dégradés par les actinomycètes et les membres du genre bactérien *Bacillus*. La dégradation plus complexe de la lignine peut être effectuée par des bactéries aérobies des genres *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* ou *Pseudomonas*. Les produits qui en résultent alors sont une variété de petits acides aromatiques et d'alcools.

La dégradation de ces produits végétaux favorise la croissance de bactéries putréfiantes qui vont dégrader les protéines en polypeptides, en peptides et, finalement en CO₂ et NH₃ suite à l'action de plusieurs enzymes microbiens (Atlas et Bartha, 1981).



(1) Réaction proposée mais non démontré

(2) Réaction démontrée chez *Streptomyces* sp. EC1

(2) Réaction observée chez *Thermomonospora mesophila* and *Streptomyces badius*

Figure 7: Processus de dégradation de la lignine tel que proposé par Godden et al., 1992.

1.5 Les levures et la dégradation de la matière végétale

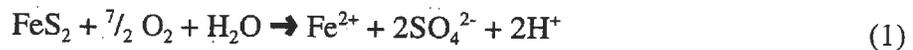
Les levures jouent un rôle plutôt marginal par rapport aux autres microorganismes impliqués dans la dégradation du bois. Les levures peuvent métaboliser autant en condition aérobie que qu'anaérobie (Rose et Harrison, 1971). Par contre, les mécanismes énergétiques utilisés sont différents dans les deux conditions et ne présentent pas la même efficacité.

Dans des conditions aérobiques, les levures utilisent l'oxygène comme accepteur final d'électron suite à la dégradation des sucres. Cette dégradation se produit à l'intérieur de la cellule au contraire de ce qui est observé avec les champignons. La source principale d'énergie pour les levures est le glucose mais d'autres sucres peuvent être utilisés. En plus du glucose, des levures peuvent utiliser le mannose et le galactose grâce aux enzymes mannose phosphate isomérase, UDPG-épimérase et phosphoglucomutase (Rose et Harrison, 1971). D'autre part, les conditions anaérobiques, les levures utilisent d'autres molécules comme accepteur final d'électrons, par exemple, les nitrates ou les sulfates.

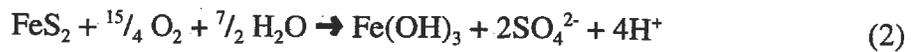
Les produits de dégradation obtenus par les métabolismes aérobiques et fermentatifs des levures sont reliés à l'utilisation des sucres comme source d'énergie. Certaines de ces substances peuvent être inhibitrices pour les microorganismes environnants. Des substances gazeuses, telles l'éthanal, le CO₂, le glycérol et l'acide acétique, résultent aussi de la dégradation des sucres, et ces produits ne peuvent alors plus être disponibles pour la croissance d'autres microorganismes.

1.6 Le cycle du soufre.

Le cycle de soufre est un facteur très important dans le processus de lixiviation des métaux présents dans les résidus miniers. *Thiobacillus ferrooxidans* et *Thiobacillus thiooxidans* peuvent dégrader la pyrite (FeS₂), pour obtenir de l'énergie selon l'équation suivante (Blowes et al., 1995).



Cette réaction produit deux molécules de H⁺ pour chaque molécule de pyrite. Selon le niveau du pH, une seconde réaction peut se produire (Gould et al., 1994) qui donne deux molécules de H⁺ de plus que la première équation (Blowes et al., 1995).



Des bactéries réductrices de sulfates sont capables d'enlever le soufre des sulfates et de produire de l'H₂S selon les étapes suivantes (Béchar, 1993).





Ces réactions peuvent être effectuées par plusieurs types de bactéries dont *Desulfotomaculum* (voir annexe 4). Ainsi, le sulfate est transformé en HCO_3^- et 3HS^- ; et les deux ions H^+ vont être captés par le HCO_3^- de façon à former de l'eau et du CO_2 (4)

Les HS^- en présence d'ions H^+ font devenir du H_2S (réaction 5). Cette production d' H_2S est augmentée lorsque le pH est bas (Béchar, 1993). En plus, cette réaction favorise l'enlèvement du Fe^{2+} par la formation de FeS insoluble qui est alors précipité.



Donc, les bactéries réductrices de sulfates peuvent diminuer l'acidité du lixiviat et diminuer les ions ferreux présents par la formation de molécules d'eau, de H_2S et de FeS .

En tenant compte de toutes ces réactions, les bactéries réductrices de sulfates peuvent améliorer le système. Elles sont capables d'enlever les métaux lourds des lixiviats.

2 PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS SUR LE TERRAIN

2.1 Conditions environnementales

Un échantillonnage adéquat joue un rôle très important dans l'évaluation des processus microbiologiques d'un site. La complexité des conditions environnementales influence la diversité des microorganismes. Parmi les facteurs les plus importants, on peut nommer le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la température et l'humidité. Les deux derniers facteurs sont fortement influencés par les saisons.

Température - La température influence la croissance ou la décroissance des microorganismes (voir annexe 5). En général, on peut s'attendre à une augmentation de l'activité microbiologique avec une augmentation de la température, jusqu'à ce que le métabolisme d'un organisme atteigne sa température optimale, qui varie selon le type et l'espèce d'organisme. La température moyenne mensuelle au site East Sullivan au cours de la saison d'été varie de 17,1 °C (juillet), 15,5°C (août), 10,4°C (septembre) à 4,6°C (octobre) alors que les températures extrêmes varient de -13,3 à 36,2°C (Tassé et al., 1992). Les variations de température à l'intérieur de la couche organique ne sont pas connues.

Humidité - Au milieu des résidus miniers et de la couverture forestière, l'humidité reste plus ou moins stable, mais à la surface, les conditions environnementales favorisent une diminution de la teneur en eau. L'activité microbienne dans la couverture varie en fonction de l'humidité. La saturation en eau de la partie supérieure peut être causée par l'intensité élevée des précipitations (l'équivalent des précipitations mensuelles au cours de 24hrs) (tableau 5). Même si l'action capillaire maintient un niveau plus ou moins constant d'humidité, les précipitations peuvent augmenter ce niveau, ou le faire baisser. Selon le changement de niveau, on peut distinguer une frontière entre les zones aérobies et anaérobies qui varient en fonction de la saison.

Tableau 5: Les précipitations mensuelles au site East Sullivan

mois	minimum	moyenne	maximum
	pluie/neige mm / cm	pluie/neige mm / cm	pluie/neige mm / cm
Juillet	32,4 / 0	101,5/0	201,4/0
Août	52,0 / 0	101,1/ 0	169,2/0
Septembre	61,6 / 0	106,1/1,2	138,3/8,0
Octobre	45,0 / 1,9	68,5 /14,5	110,4/35,4

Source: (Environnement Canada, Tassé et al., 1992)

pH - Le pH de l'environnement influence le développement des organismes qui peuvent vivre dans un tel endroit. Chaque organisme, que ce soit une levure, une bactérie ou une moisissure, croît à l'intérieur de ses limites optimales de pH (voir annexe 3).

Potentiel d'oxydo-réduction - La couverture végétale montrant différents degrés de saturation d'eau, ou différentes densités ou degrés de tassement est exposée à des conditions d'oxydo-réduction variables. La partie supérieure est bien aérée, mais le milieu devient anoxique et ensuite anaérobique au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans les résidus miniers. La mesure du potentiel d'oxydo-réduction est une information importante sur les espèces microbiennes présente en fonction des conditions de respiration (ie. métabolisme aérobie, anaérobie, anoxique, méthanotrophique, sulfurique).

2.2 **La stratification de la couverture végétale et des résidus miniers**

Les résidus forestiers sont exposés à des différentes conditions environnementales affectant les différentes parties de ce matériel (température, pH, potentiel d'oxydo-réduction et humidité). Par conséquent, les résidus ligneux peuvent contenir plusieurs zones d'activité microbienne. La zone 1 est exposée à la lumière, à la sécheresse ou à la saturation d'eau (pleine ou partielle). La zone 2 est moins exposée aux conditions environnementales à cause d'une température et d'une humidité plus stables que dans la zone 1. La zone 3 est la zone transitoire, où l'on peut trouver des conditions aérobiques et anaérobiques. La zone 4 est celle de la respiration anaérobie. La zone 5 est celle des résidus miniers, où l'on trouve des bactéries réductrices de sulfates et de fer. Un échantillonnage dans chacune de ces zones est nécessaire.

Afin d'évaluer les interactions dans les systèmes microbiologiques au sein du site East Sullivan, il faudra prélever des échantillons dans les endroits différents. L'échantillonnage devrait être effectué en fonction des zones caractéristiques de la couverture végétale et des résidus miniers (Figure 8, tableau 6).

Tableau 6 Stratification de la couverture végétale.

Code	Zone	Code	Zone
RF -	Résidus forestiers		
RM -	Résidus miniers		
L -	Lixiviats		
RF1	Niveau exposé à la lumière(the elements)	L1	Zone de drainage
RF2	Zone aérobie	L2	Zone de résidus forestiers (fluide interstitielle)
RF3	Zone transitoire		
RF4	Zone anaérobie	L3	Zone de résidus miniers(fluide interstitielle)
RM1	Zone anaérobie		

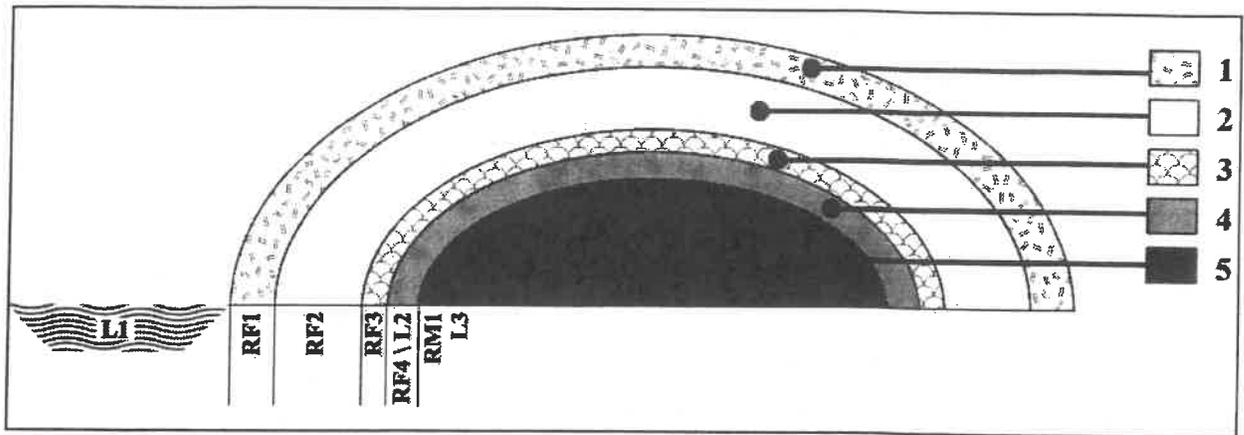


Figure 8. Le zonage présumé de la couverture forestière (zones 1 à 4- résidus végétaux): 1-zone exposée à la lumière, 2-zone aérobie, 3-zone transitoire, 4-zone anaérobie, 5-zone anaérobie des résidus miniers.

2.3 Les microorganismes trouvés dans chaque zone

À cause de la variété des conditions environnementales, il est nécessaire de faire l'identification des microorganismes présents dans chacune des zones et de décrire leur pouvoir de survie dans ces conditions.

2.3.1 RF1 Niveau exposé à la lumière

À ce niveau, on trouvera la plus grande variété d'activités microbiologiques à cause des conditions environnementales les plus variables résultant de la pluie, de la neige, du gel/dégel, de la température (voir annexe 5) et de la lumière. Ces changements influencent non seulement la croissance microbienne mais l'activité métabolique de dégradation.

La couverture végétale est exposée aux températures extrêmes qui créent des exigences très difficiles pour les microorganismes. Les températures chaudes entraînent l'évaporation et augmentent la pression hydrique. Il y a des microorganismes qui peuvent vivre pour de longues périodes de sécheresse, sous forme des spores, mais aucune croissance ne pourra être détectée pendant ces périodes.

Comme cette zone est aérobie, il est prévisible de trouver des organismes aérobiques incluant des actinomycètes ou des moisissures, dépendant de la période exacte de l'échantillonnage (voir annexe 3). En plus, grâce à la dégradation de la couverture végétale, des bactéries du genre *Bacillus* ou/et des bactéries putréfiantes pourraient être aussi présentes.

2.3.2 RF2 Zone aérobie

Dans les autres zones, des conditions environnementales plus stables devraient s'y trouver. L'échantillonnage doit être effectué dans des zones similaires pour les deux types de résidus de bois. Il est à prévoir que la composition de la flore microbienne soit plus constante que dans la zone RF1.

Les analyses microbiologiques devraient montrer la présence de microorganismes aérobies (voir annexe 1), particulièrement ceux qui sont cellulolytiques et lignolytiques. Cette zone devrait être l'habitat des moisissures (eg. *Armillaria*), potentiellement des levures (capable d'utiliser les substrats de certains sous-produits de d'autres microorganismes), ainsi que des bactéries aérobies (eg. *Bacillus*), et des actinomycètes (*Streptomyces*).

2.3.3 RF3 Zone transitoire

Grâce à la saturation variable en eau de la couverture forestière, la zone transitoire peut être exposée à un métabolisme aérobie et anaérobie. On s'attend à trouver des microorganismes facultatifs capables de vivre dans les deux conditions ou capables de supporter un niveau moyen d'anaérobiose pendant les périodes moins favorables (voir annexe 1). Des levures capable de se développer dans les deux conditions pourraient être favorisées. Il faut aussi considérer, qu'à cause de la fluctuation de niveau d'eau, les microorganismes pourront monter de la zone RF4, ou descendre de la zone RF2 afin de survivre.

2.3.4 RF4 Zone anaérobie

La couverture forestière est saturée en eau près de la zone des résidus miniers, favorisant la présence de conditions d'anaérobiose. Dans cette zone, seuls les organismes anaérobies obligatoires pourront croître. Comme c'est une zone contenant des résidus forestiers, des microorganismes cellulolytiques, incluant le *Clostridium* pourront s'y développer. Il est possible aussi de trouver des microorganismes qui sont réducteurs de sulfates. Ceci pourraient résulter du fait que les organismes qui se trouvent dans la zone RM1 transforment les résidus miniers contenant du fer et du soufre par un processus de lixiviation et que la présence de matières nutritives de la zone RF4 pourrait favoriser le passage de ces microorganismes de la zone RM1 en zone RF4.

Dans cette zone, dépendant des facteurs environnementaux, on s'attend à trouver principalement les microorganismes suivants: *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio* et des levures.

2.3.5 RM1 Zone de lixiviation anaérobique

Dans cette zone, seules les bactéries anaérobiques strictes et lithotrophes pourront se développer à cause de leur capacité à utiliser les métaux comme source d'énergie ou des produits de dégradation de la matière végétale présente dans les couches au-dessus de la zone RM1. Il est encore possible de trouver des microorganismes capables de dégrader la matière végétale dans cette zone mais leur nombre sera beaucoup inférieur à cause de la matière organique déjà partiellement dégradée en provenance des couches supérieures. Aussi, il existe une forte possibilité qu'une certaine quantité de métaux ait pu diffuser de la zone RM1 à la zone RF4 à cause de l'évaporation produite dans les couches supérieures.

En conséquence, il est à prévoir que des microorganismes des genres *Desulfotomaculum* ou *Desulfovibrio* puissent être détectés. Dans cette zone, il faudra aussi rechercher des microorganismes impliqués dans la réduction du fer quoique leur présence est peu probable à cause de leur métabolisme strictement aérobique mais la présence d'une certaine quantité d'oxygène n'est pas à négliger si la couverture végétale ne l'a pas complètement absorbé. Alors les bactéries lithotrophes des genres *Thiobacillus* et *Leptospirillum* seront actives.

2.3.6 L1 Zone de drainage

La zone de drainage entourant l'amas de résidus forestiers peut contenir différents microorganismes. Leur diversité peut donner de l'information sur l'efficacité de la dégradation de la couverture végétale. La présence de sous-produits du métabolisme des produits ferreux dans les lixiviats sera une indication de l'activité métabolique de bactéries réductrices de sulfates. Leur présence suggèrera une efficacité non-optimale de la couverture végétale à cause de la croissance de ces microorganismes et de la production possible d' H_2SO_4 . La dégradation de la matière végétale va entraîner la présence de plusieurs sous-produits, tels que listés dans les tableaux 3 et 4 ainsi qu'une masse microbienne comprenant des bactéries des genres *Thiobacillus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Leptospirillum*, et certaines levures.

2.3.7 L2 Zone d'eaux interstitielles des résidus forestiers

L'échantillonnage dans la zone L2 permettra de trouver les microorganismes qui se trouvent dans les eaux interstitielles des résidus végétaux. On peut s'attendre à trouver deux types principaux d'organismes dans la couverture forestière: ceux qui s'attachent aux résidus forestiers et ceux qui utilisent ces résidus. D'autres microorganismes qui ne se nourrissent pas directement des résidus forestiers, mais plutôt des sous-produits (eg. glucose, d'autres sucres) formés par *Clostridium* ou des levures, par exemple, pourraient s'y retrouver.

Le pH, le potentiel d'oxydo-réduction et la température jouent un rôle très important dans la croissance de la vie microbienne et des modifications dans ces conditions pourraient rapidement entraîner un changement de la flore microbienne présente par une autre (voir annexes 3 et 5).

2.3.8 L3 Zone d'eaux interstitielles des résidus miniers

Dans cette zone, les échantillons seront obtenus à partir des liquides interstitiels drainant les résidus miniers. Des sous-produits de la dégradation du bois et de la transformation des métaux favoriseront la croissance de bactéries capables de les utiliser. Selon l'état des métaux et du niveau de dégradation de la matière végétale, des bactéries des genres *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfovibrio*, *Leptospirillum*, *Thiobacillus* ainsi que des levures pourraient être identifiés.

2.4 Le protocole de prélèvement

2.4.1 L'échantillonnage

L'échantillonnage pour les études microbiologiques doit être effectué dans les mêmes zones que celles sélectionnées pour les analyses physico-chimiques (Tassé et Germain, 1996) (figure 9). Par conséquent, les échantillons pour les zones RF1, RF2, RF3, RF4 et RM1 devraient être prélevés dans les endroits C0, C1, C5, C6, C7 et C8. Toutefois, la décision finale des sites de prélèvement devrait être effectuée après la visite du site.

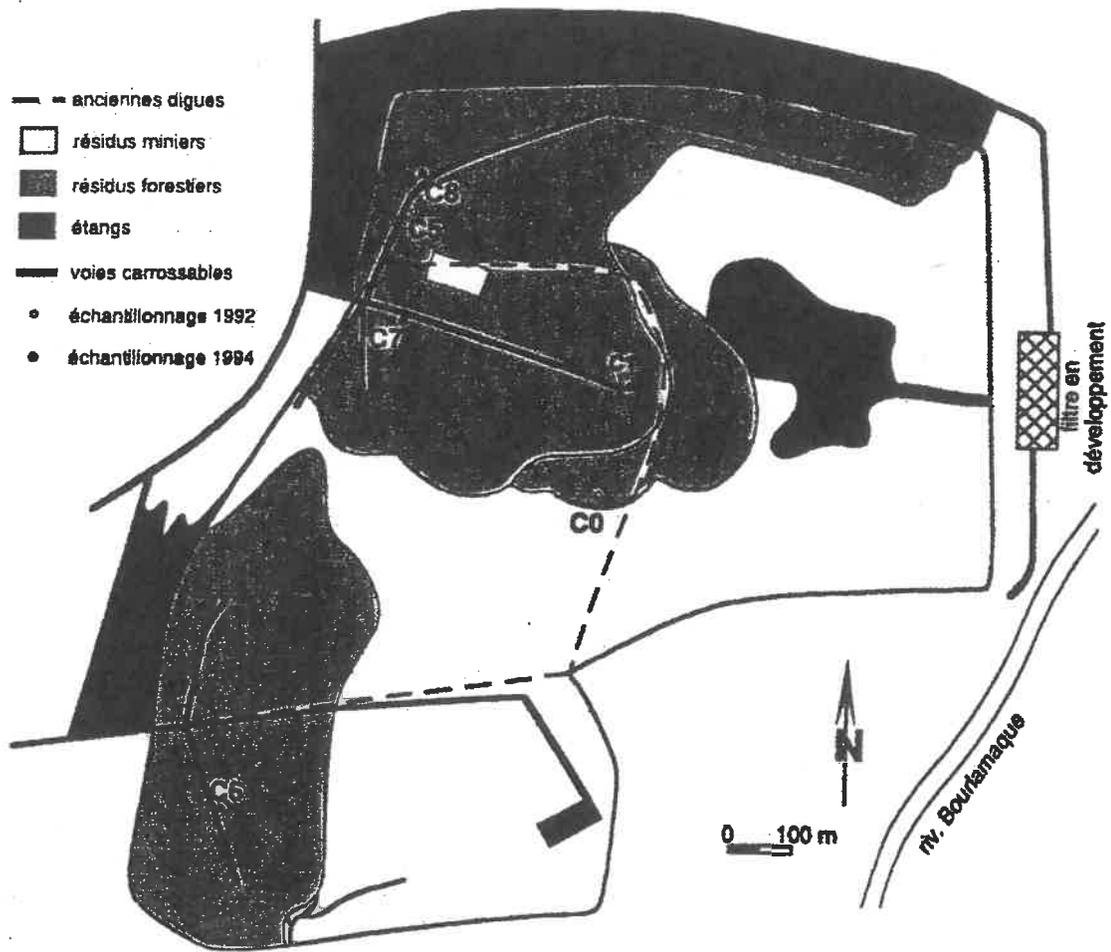


Figure 9 Les sites proposés de prélèvement des échantillons - East Sullivan(Tassé et Germain, 1996)

du résidu forestiers ont été utilisé sur le site de East Sullivan. On y trouve de l'épinette noire (*Picea Mariana*) et du tremble (*Populus tremuloides*) selon trois modalités:

- L'épinette noire seulement
- Le tremble seulement
- Un mélange du tremble et l'épinette noire

Il faudra prendre des échantillons de chaque mélange de bois et des lixiviats, pour avoir le profil microbiologique de la couverture végétale et de ses processus métaboliques.

Afin d'identifier les microorganismes présents dans les eaux interstitielles, des échantillons seront prélevés aux sites L2 et L3. Des lixiviats de drainage de l'étang (L1) destinés aux filtres biologiques et au marais artificiel pourraient aussi être échantillonnés.

2.4.2 Le prélèvement et transport de l'échantillon

Le prélèvement des échantillons pour les études microbiologiques doit être effectué avec une grande précaution et dans les conditions les plus stériles possibles. Le nombre d'échantillon sera déterminé après une visite sur le site. Après chaque prélèvement d'échantillon, les mesures de pH, du potentiel d'oxydo-réduction et de la température seront nécessaires afin de relier les conditions environnementales favorables à la croissance de chaque type microbien (voir annexe 3 et 5).

L'approche d'un échantillonnage dispersé et stratifié aux différentes profondeurs peut être appliquée dans ce type d'étude. La méthode de forage et de prélèvement au site doit être adaptée aux conditions particulières sur le terrain, selon une des méthodes pour les tests microbiologiques pour un sol organique, tel que proposé par le "Soil Sampling and Methods of Analysis" (Carter, 1993).

Une fois que l'échantillon aura été prélevé, il sera placé dans un contenant stérile et gardé à la température de 4°C pour diminuer l'activité microbiologique (Amaro et al. 1991; Blais et al. 1992; Takeuchi et al. 1994) jusqu'à son arrivée au laboratoire.

Ce test est effectué par des dilutions décimales de la matière organique dans des milieux de culture adaptés à chacun des grands groupes de microorganismes. De trois à 10 tubes sont utilisés pour chaque dilution (10^{-1} à 10^{-10}) d'un échantillon. Après incubation, le nombre de microorganismes est évalué selon une table de probabilité en fonction de la dernière dilution où la croissance microbienne est encore détectable (Southam et Beveridge, 1992).

L'évaluation du nombre le plus probable de champignons se fait à l'aide d'un milieu de culture Sabouraud, celui des actinomycètes, par culture dans un milieu glycérol et finalement des bactéries, dans différentes géloses selon le type d'échantillon. Il est possible d'évaluer l'importance des anaérobies en faisant un test semblable mais dans des conditions anaérobiques.

Il est à prévoir que, dans les échantillons prélevés à la surface de la matière ligneuse, des champignons, moisissures et bactéries aérobies seront en forte quantité alors que plus en profondeur, seules les bactéries anaérobies ou facultatives pourront y être dénombrées.

3.3.2 Tests morphologiques

3.3.2.1 Coloration de Gram

Cette technique permet, en une seule étape, de visualiser la diversité morphologique des champignons et moisissures, et la présence de formes bactériennes ainsi que la nature de leur paroi (Gram- et Gram+)(Wistreich et Lechtman, 1988). Ainsi, nous pourrions obtenir des informations concernant la forme, l'arrangement, les dimensions et la nature de la paroi des bactéries mais aussi une appréciation des types de champignons présents par la forme des organes de sporulation.

3.3.2.2 Microscopie à contraste de phase

Cette méthode permet de visualiser à l'état vivant les microorganismes, contrairement à la coloration de Gram, qui se fait sur les cellules fixées. Il est donc possible de voir la mobilité en plus de la forme des microorganismes. L'utilisation de la microscopie à contraste de phase est particulièrement utile pour la détection de formes bactériennes spiralées et mobiles, ce qui est à prévoir (Goebel et Stackebrandt, 1994, 1996).

3.3.2.3 Coloration à l'acridine orange

Cette méthode de coloration permet d'évaluer les pourcentages de microorganismes viables par rapport à ceux en processus graduel de dégénérescence. La teinture d'acridine orange se fixe à l'ADN microbien en autant que la membrane cytoplasmique puisse la laisser pénétrer. Normalement, un microorganisme viable est capable d'empêcher l'entrée de ce colorant alors que celui en processus de mort ne le peut plus. Donc, les microorganismes moribonds apparaîtront rouges alors que ceux qui sont viables exprimeront une couleur verte (Paul et Clark, 1989; Johnson et al. 1992).

Dans des conditions normales, c-à-d en absence de conditions environnementales difficiles ou

de produits toxiques, la mortalité des microorganismes, par cette méthode est d'environ 2%. Il est à prévoir que les conditions élevées d'acidité et de solubilisation de métaux lourds présentes à la mine East Sullivan entraîneront des taux de mortalité de plus en plus forts alors qu'on s'approchera des résidus miniers.

3.4 Tests métaboliques généraux et spécifiques

Afin d'évaluer l'efficacité des processus métaboliques des microorganismes, deux approches seront utilisées, la première révèle le niveau métabolique général alors que la seconde évalue la qualité du processus de dégradation des composants végétaux.

3.4.1 Le test MTT(Promega, Madison WI)

Ce test est basé sur le niveau de conversion de sels de tétrazolium en des cristaux de formazan bleu facilement détectables par colorimétrie dans des microplaques d'ELISA. Cette méthode permet d'évaluer le niveau d'activité des déshydrogénases mitochondriales qui sont en relation avec le niveau métabolique général de la cellule microbienne (Rodriguez, 1992). Ainsi, les échantillons seront dilués de façon décimale, dans des milieux de culture appropriés et, après une incubation de 24hrs à 37°C, le colorant(MTT) sera ajouté pour une incubation de 4 hrs. Une solution de solubilisation des cristaux sera ajoutée et la lecture au colorimètre se fait, après une incubation d'une heure, avec un filtre à 570nm.

3.4.2 Cellulolyse aérobie et anaérobie

Le principe de ce test est d'ensemencer des suspensions de microorganismes dans un milieu liquide où la seule source de carbone sera apportée par une feuille de papier filtre qui sera dégradée par les enzymes cellulolytiques s'ils sont présents (Pochon et Tardieux, 1962).

Les échantillons seront dilués de 10^{-1} à 10^{-6} dans un milieu de culture liquide contenant une bande de papier filtre. Après 15 jours d'incubation à 28°C, la croissance de microorganismes cellulolytiques aérobies se traduira par la présence de taches pigmentés sur le papier ou sa fragmentation. Selon la dernière dilution où la cellulolyse se sera produite, il sera possible de calculer le nombre de microorganismes cellulolytiques dans l'échantillon initial. La cellulolyse anaérobie sera évaluée par la même technique mais dans des conditions d'anaérobiose. Selon la quantité de microorganismes cellulolytiques retrouvés, des méthodes d'identification seront sélectionnées.

3.4.3 Hémicellulolyse aérobie et anaérobie

Dans ce test, il s'agit de fournir aux microorganismes de l'hémicellulose purifiée comme seule source de carbone et d'évaluer la production de nitrates à partir des nitrites du milieu dont la formation est en relation avec la dégradation de l'hémicellulose (Pochon et Tardieux, 1962).

Les échantillons seront dilués, tel que décrit en 3.4.2 dans un milieu sélectif et après une incubation séquentielle (1 à 15 jours) à 28°C, le réactif de Griess sera ajouté afin de révéler la présence de nitrates, se traduisant par une coloration rose. L'hémicellulolyse anaérobie sera similairement évaluée dans des conditions d'anaérobiose.

3.4.4 Réduction des sulfates

Comme la présence des bactéries réductrices du soufre peut jouer un rôle intéressant dans l'augmentation du pH et la précipitation de métaux, il est possible de vérifier si les bactéries présentes dans le lixiviat peuvent réduire le soufre oxydé. La technique préconisée consiste à faire croître les bactéries isolées en culture dans un milieu liquide sulfaté en présence d'un clou en fer. Au bout de trois semaines d'incubation, la présence d'un dépôt noir autour du clou indique une activité réductrice (Pochon et Tardieux, 1962).

3.5 Isolement des Microorganismes

Les méthodes d'analyse de la diversité morphologique des organismes vont nous permettre de déterminer la nature des microorganismes présents dans l'échantillon. Dépendant de ces résultats, les techniques d'isolement seront choisies en conséquence et ce, pour chaque échantillon. Ainsi, en présence de champignons et moisissures seulement ou de bactéries et actinomycètes ou de mélange de ces microorganismes, des milieux de culture et de conditions physiques particulières seront déterminés.

3.5.1 Isolement et identification des champignons et moisissures

Afin d'isoler de façon pure, les champignons et les moisissures présents dans un échantillon, des dilutions décimales de l'échantillon seront utilisées pour ensemercer des géloses de type Sabouraud, rose bengale ou pomme de terre-dextrose (Pochon et Tardieu, 1962) avec un volume de 1ml. Les géloses seront incubées à la température de la pièce durant 3 à 5 jours.

La gélose où le nombre de colonies obtenues variera entre 20 et 200 sera sélectionnée comme étant représentative de l'échantillon tout en permettant une séparation adéquate entre les colonies de chaque type de microorganismes. Selon les caractéristiques morphologiques et macroscopiques des colonies, trois colonies représentatives de chaque type morphologique seront prélevées et identifiées par microscopie après une coloration simple. Ce microorganisme sera identifié morphologiquement tel que défini par Paul & Clark, 1989. Il est à prévoir qu'environ de 20 à 30 types différents de colonies pourront être observés.

3.5.2 Isolement et identification des actinomycètes

Une méthode d'isolement similaire à celle décrite pour les champignons-moississures (section 3.5.1) sera utilisée pour les actinomycètes. Par contre, la nature du milieu de culture sera différente, telle que décrite par Pochon et Tardieu(1962). Les colonies seront sélectionnées tel que décrit à la section 3.5.1 et analysées morphologiquement et colorées par la technique de Gram. Cette approche classique a l'avantage d'être plus facile mais soulève un problème d'identification car il est assez difficile, microscopiquement, de séparer les bactéries des actinomycètes selon leur forme et leur Gram.

Ce problème peut être surmonté par la méthode décrite par Hirsh et Christensen (1983) qui permet de séparer les colonies d'actinomycètes des colonies bactériennes par le fait que les actinomycètes peuvent produire des hyphes et non pas les bactéries. Cette méthode se différencie de la première par le fait qu'un filtre avec des pores de trois diamètres différents est déposé sur la gélose avant l'ensemencement. Après ensemencement et incubation, les colonies d'actinomycètes feront des hyphes qui vont traverser le filtre et se rendre sur la gélose. Le filtre sera alors enlevé et les hyphes présents sur la gélose vont alors croître et reformer des colonies qui pourront être alors identifiées, tel que précédemment décrit (Paul & Clark, 1989). L'identification morphologique risque de ne pas être suffisante, ce qui nécessitera une variété de tests biochimiques pour identifier définitivement le microorganisme.

3.5.3 Isolement et identification des bactéries

La préparation de l'échantillon et les dilutions décimales, tel qu'indiqué à la section 3.5.1, sont identiques sauf que deux types de gélose seront utilisés: la première consistant en un "extrait dit de terre" et la seconde, une gélose dite nutritive. Il y a aussi des géloses qui ont été développées afin d'isoler les bactéries hétérotrophiques et acidophiliques (Johnson et al., 1992; Khalid et al., 1993). Les géloses seront incubées en aérobie et en anaérobie à la température de la pièce et/ou à 37°C. Tel que précédemment décrit, des colonies seront sélectionnées selon leurs caractéristiques macroscopiques et une coloration de Gram sera effectuée en même temps qu'un examen en microscopie à contraste de phase, pour évaluer la mobilité.

L'identification bactérienne nécessite absolument une série de tests métaboliques adaptés à chacun des genres bactériens correspondant aux observations macroscopiques et microscopiques de chaque colonie sélectionnée, tel qu'indiqué dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Dans le cadre de ce travail, des décisions à ce sujet devront alors être prises en fonction des résultats obtenus à cette étape (système API-E; Bio-Mérieux).

3.5.4 Isolement et identification des levures

Advenant la présence de levures dans les échantillons, des colonies présentant des caractéristiques morphologiques de levures pourront être isolées en même temps que les champignons-moississures. Leur identification sera réalisée par une coloration de Gram

(caractéristiques morphologiques et présence de bourgeonnement) et par des tests biochimiques appropriés selon les observations morphologiques.

3.6 Méthodes moléculaires d'identification bactérienne

Afin de pouvoir assurer un suivi temporel de l'évolution de certaines bactéries lithotrophes au cours de processus de dégradation du couvert végétal et de sa capacité à contrôler ces espèces bactériennes responsables de l'acidification des lixiviats, il faudrait pouvoir avoir accès à des méthodes plus rapides mais tout aussi spécifiques que la culture et l'identification métabolique. Pour certains genres bactériens, de nouvelles méthodes basées sur la structure de l'ADN ou la présence d'antigènes spécifiques de surface pourraient être envisagées.

3.6.1 Identification bactérienne par hybridation à l'aide de sondes d'ADN

Plusieurs techniques peuvent être utilisées en autant que des sondes d'ADN spécifiques puissent être disponibles. Ces tests sont utiles particulièrement dans des mélanges de microorganismes car ils peuvent détecter une population bactérienne représentant seulement 1% de la population totale (Muyzer et al, 1993). L'autre avantage est celui de pouvoir tester un grand nombre d'échantillons simultanément.

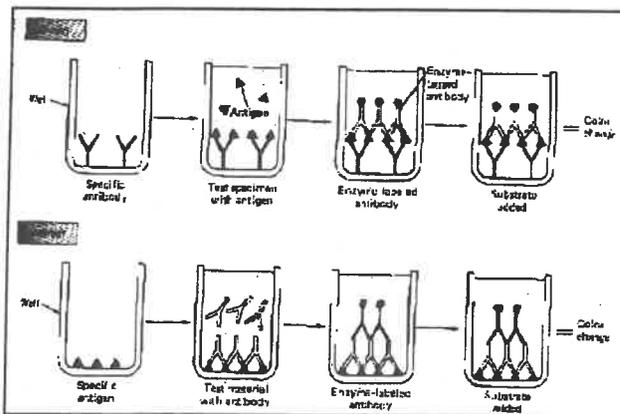
Ainsi, l'utilisation de fragments d'ADN obtenus à l'aide d'endonucléases de restriction a permis l'identification d'espèces de *Desulfovibrio* (Telang et al., 1994). Ces chercheurs ont obtenu des fragments d'ADN pouvant être séparés selon leur longueur par une technique d'empreinte de Southern. Les fragments d'ADN bactérien, séparés par électrophorèse seront subséquemment transférés sur une membrane de nitrocellulose et mis en contact avec des sondes d'ADN complémentaires radioactives. Par autoradiographie, il est possible de détecter la présence de gènes spécifiques à ce genre bactérien.

Cette technique a aussi été mise au point pour différencier les espèces de *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* et *Leptosprillum ferrooxidans* à l'aide de sondes spécifiques (Pizarro et al., 1996). Cette méthode peut être directement utilisée pour la recherche de ces bactéries dans des échantillons suite à l'extraction de l'ADN après la lyse des cellules bactériennes et, après plusieurs lavages, à sa fragmentation par des enzymes de restriction dans des séquences données. Ces fragments seront ensuite amplifiés par une méthode dite de PCR (polymérase chain reaction). Les fragments d'ADN spécifiques à ces bactéries seront identifiés par comparaison avec les souches-types suite à une électrophorèse, via les bandes d'ADN obtenus. La technique PCR devrait être de plus en plus utilisée dans un proche avenir à mesure que des sondes spécifiques seront disponibles (Jensen et al., 1993).

3.6.2 Identification des bactéries lithotrophes à l'aide d'anticorps spécifiques

3.6.2.1 Immunofluorescence

Les tests utilisant l'immunofluorescence présente l'avantage d'identifier spécifiquement chaque espèce de bactéries. Les espèces bactériennes possèdent leurs propres marqueurs, appelés antigènes, qui sont présents dans leur paroi. Muyzer et al. (1987) ont utilisé cette propriété pour mettre en évidence la présence de *Thiobacillus ferrooxidans* dans un échantillon sans nécessiter de techniques d'isolement. Pour ce faire, il ont fabriqué un antiserum de lapin contenant des anticorps spécifiques reconnaissant les antigènes de cette bactérie. Il s'agit alors de fixer à chaleur la suspension bactérienne sur une lame microscopique, d'ajouter l'antisérum spécifique de lapin et, après incubation et lavages, de déposer sur la lame un antiserum anti-anticorps de lapin couplé à fluorescéine. Les bactéries où l'anticorps a été spécifiquement fixé apparaîtront fluorescentes et pourront alors être relativement dénombrées. Cette méthode possède l'avantage de détecter la présence d'une bactérie à partir d'un mélange sans nécessiter un isolement par culture.



(A) Figure 10. Processus des méthodes d'immunofluorescence directe (A) et indirecte (B). (Wistreich Lechtman, 1988)

(B)

3.6.2.2 ELISA

Cette seconde méthode immunologique est nommée par le sigle ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay) et consiste en la reconnaissance d'antigènes spécifiques pour une espèce bactérienne par des anticorps correspondants via un processus d'amplification enzymatique. Muyzer et al. (1987) ont utilisé cette méthode pour analyser les antigènes de *Thiobacillus ferrooxidans*. Les antigènes bactériens ont été fixés à la paroi de godets de microplaques. Les anticorps ont alors été ajoutés et, après incubation, les microplaques ont été lavées. Un second anticorps, couplé à la phosphatase alcaline, a été déposé dans chacun des godets et, après incubation et lavage, un substrat spécifique à cet enzyme, tel le p -nitrophényl-phosphate, a été ajouté. Si le second anticorps s'est fixé sur le premier aussi fixé sur l'antigène, l'enzyme a été en mesure d'agir sur le substrat et de produire une réaction colorée qui peut alors être quantifiée par colorimétrie à 405nm.

3.7 Evaluation de l'efficacité de la recirculation des lixiviats sur le couvert végétal

Afin d'évaluer en laboratoire l'efficacité de la recirculation des lixiviats sur le couvert végétal pour profiter des réactions de dégradation microbienne responsables de la réduction du niveau d'acidité et de substances toxiques, il est important de vérifier les effets inhibiteurs des lixiviats sur la croissance des microorganismes déjà présents dans le couvert végétal. Ces effets inhibiteurs pourraient entraîner une diminution importante de la capacité de dégradation des résidus végétaux de la flore microbienne qui s'y est installée. En absence d'effets inhibiteurs, la recirculation des lixiviats serait appropriée afin de maintenir un niveau d'humidité suffisant pour maximiser ces processus de dégradation microbienne.

PROJET

La détection d'effets inhibiteurs des lixiviats passe par une évaluation de la diminution du nombre de microorganismes et de leur activité métabolique. Dans un tel cas, il est à prévoir que chaque microorganisme présentera une sensibilité spécifique vis-à-vis la toxicité des lixiviats. Il sera alors important d'identifier la nature des microorganismes résistants afin d'en déduire leurs capacité de dégradation de la matière végétale.

1. La première étape consistera en l'évaluation de la masse microbienne viable et sa diversité, tel que défini à la section 3.3.
 1. Le test du nombre le plus probable
 2. Les tests morphologiques
 - coloration de Gram
 - coloration à l'acridine orange
2. En deuxième lieu, l'inhibition ou la diminution des activités métaboliques de la flore microbienne en contact avec le lixiviat sera évaluée tel que défini à la section 3.3.2.2 et 3.4.
 1. Microscopie à contraste de phase pour la réduction de mobilité
 2. Test MTT
 3. Tests de dégradation
 - de la cellulose
 - de l'hémicellulose
 - de la lignine
3. Finalement, les microorganismes résistants aux effets toxiques du lixiviat seront identifiés, tel que montré dans la section 3.5.
 1. Champignons et moisissures
 2. Actinomycètes
 3. Bactéries
 4. Levures.

Conclusion

Ce travail avait comme but d'effectuer une recherche bibliographique qui sert à 1) caractériser et identifier des microflore présentes dans les résidus ligneux en zones aérobies et anaérobies et 2) décrire les processus de dégradation de la matière organique du couvert forestier ainsi que les processus expérimentaux de caractérisation et d'évaluation des effets de la recirculation des eaux acides.

Nous avons montré que la dégradation microbienne de la matière végétale est complexe et peut être partiellement ou totalement réalisée soit par des champignons ou moisissures, par des levures, et par des actinomycètes ou des bactéries. Ces processus de dégradation de la cellulose, de l'hémicellulose et de la lignine permettent la croissance de ces microorganismes tout en générant l'apparition de différents sous-produits selon les conditions physico-chimiques de l'environnement dans lequel se trouve la flore microbienne.

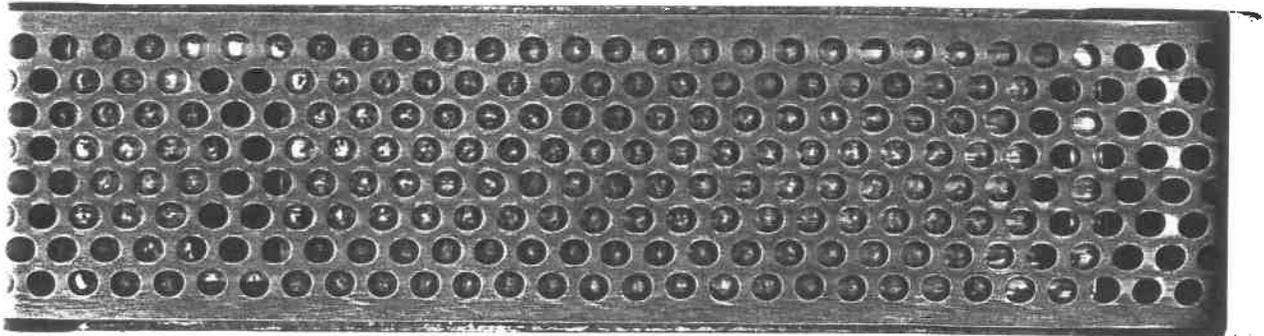
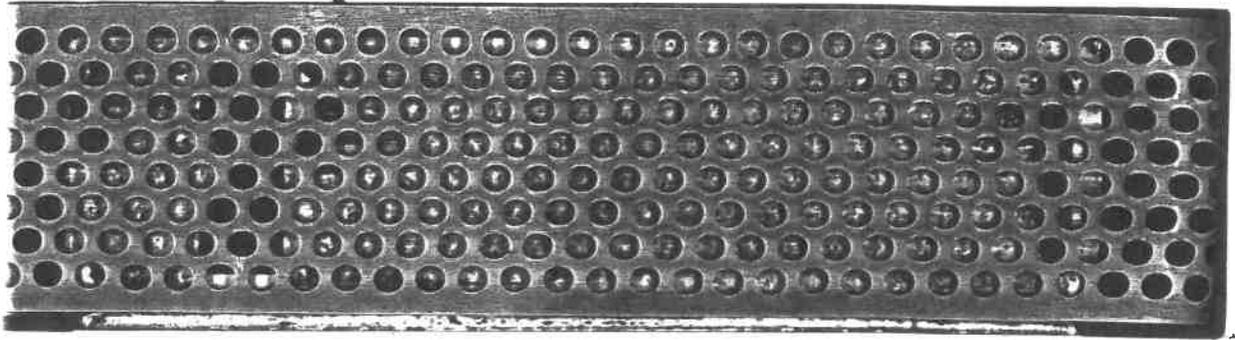
Afin d'évaluer la nature des communautés microbiennes présentes dans les endroits présentant des conditions physico-chimiques différentes, plusieurs étapes dans le processus d'échantillonnage, dans la détermination des capacités métaboliques et dans la diversité microbienne s'avèrent nécessaires. Les résultats qui pourront être obtenus par un tel projet serviront à répondre à plusieurs questions portant sur l'efficacité de la dégradation de la matière végétale, de telle sorte que peu de sous-produits indésirable soient générés, tout en corrigeant l'acidité des lixiviats produits par les bactéries lithotrophes. Compte tenu des conditions physico-chimiques particulièrement difficiles dans lesquelles doivent croître les microorganismes devant dégrader le couvert végétal, ce projet va permettre d'identifier les déséquilibres fonctionnels parmi les populations microbiennes tout en pouvant expliquer l'efficacité variable du couvert végétal en relation avec les conditions environnementales.

D'autres part, il est à prévoir que la croissance microbienne générée au cours des processus incomplets de dégradation ait pour conséquence d'augmenter la quantité de matière organique et de nécessiter une étape de traitement des lixiviats. La recirculation des lixiviats pourrait être alors une solution en autant qu'ils soient peu ou pas toxiques, ce qui n'est probablement pas le cas. Ainsi, une analyse subséquente des propriétés toxiques du lixiviat s'avère nécessaire avant d'envisager une recirculation.

Les résultats obtenus par ce projet pourront être utilisés afin d'améliorer le couvert végétal de telle sorte qu'il puisse favoriser la croissance de microorganismes capables de dégrader les matières végétales fournies dans des conditions d'aérobiose ou d'anérobiose en maximisant le processus de dégradation et en minimisant la croissance microbienne. Ainsi, en connaissant l'équilibre des populations microbiennes présentes, en fonction de leur résistance aux conditions physico-chimiques des résidus miniers, et leurs capacités métaboliques spécifiques, il sera possible de modifier la nature du couvert végétal, par exemple en utilisant des matériaux plus riches en cellulose et en hémicellulose plutôt qu'en lignine (ex: résidus de maïs) et/ou de contrôler les niveaux d'aérobiose et d'humidité de façon à favoriser un processus de dégradation par des microorganismes anaérobies qui génère moins

BIBLIOGRAPHIE

- Amaro, A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arrendono, R., Peirano, I. et Jerez, C.A. 1991. Effect of External pH Perturbations on In Vivo Protein Synthesis by the Acidophilic Bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. J Bact. 173(2): 910-915.
- Antai, S. P., Crawford, D. L. 1981. Degradation of Softwood, Hardwood, and Grass Lignocelluloses by Two *Streptomyces* Strains. Appl. Environ. Microbiol. 42(2): 378 - 380.
- Atlas, R.M. et Bartha, R. 1981. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Addison-Wesley Publishing Company. Don Mills, Ontario. pp.533
- Basham, J. T. 1958. Decay of Trembling Aspen. Can. J. Bot. 36: 491 - 505.
- Basham, J. T. 1973. Heart rot of black spruce in Ontario. II. The mycoflora in defective and normal wood of living trees. Can. J. Bot. 51: 1379 - 1392.
- Basham, J. T., Morawski, Z. J. R. 1964. Cull Studies, The defects and associated basidiomycete fungi in the heartwood of living trees in the forests of Ontario. Department of forestry publication No. 1072, 67 pages.
- Béchar, G. 1993. Microbiological Process for the Treatment of Acid Mine Drainage using Cellulosic Substrates. Thèse de PhD. Carleton University Ottawa, Ontario.
- Blais, J.-F., Auclair, J.C. et Tyagi, R.D. 1992. Cooperation between two *Thiobacillus* strains for heavy-metal removal from municipal sludge. Can. J. Microbiol 38: 181-187.
- Blowes, D.W., Al, T., Lortie, L., Gould, W.D. et Jambor, J.L. 1995. Microbiological, Chemical and Mineralogical Characterization of the Kidd Creek Mine Tailings Impoundment, Timmins Area, Ontario. Geomicrobiol. J. 13: 13-31.
- Buckley, B. M., Triska, F. J. 1978. Presence and ecological role of nitrogen-fixing bacteria associated with wood decay in streams. Verh. Internat. Verein. Limnol. 20: 1333 - 1339.
- Carter, M.R. 1993. Soil Sampling and Methods of Analysis. Lewis Publishers. Ann Arbor. pp.823.
- Chakravarty, P. 1995. Antagonistic Fungi of Aspen Decay and Stain and their Their Potential Uses *Dans: Aspen Stain and Decay Workshop Proceedings*. Canadian forest service and Land and Forest Service(Edmonton), p.32-35.
- Crane, P.E., Chakravarty P., Hutchinson, L.J. et Hiratsuka, Y. 1996. Wood degrading capabilities of microfungi isolated from *Populus tremuloides*. Material und Organismen. 30(1): 33-44.



- Davidson, A.G. et Redmond, D.R. 1957. Decay of Spruce in the Maritime Provinces. *Forestry Chronicle* 33: 373-380.
- Davis, B.S., Fortin, D. et Beveridge, T.J. 1995. Acidophilic Bacteria, Acid Mine Drainage and Kidd Creek Mine Tailings. Dans Sudbury '95 Mining and the Environment L'exploitation minière et l'environnement. p.69-78. CA1 NAT11 95 S72 Porter V.1.
- Davis, C.N. et Myren, D.T. 1987. Index of hosts and associated fungi identified by the Forest Insect and Disease Survey in Ontario from 1967 to 1987. II. Conifers other than pines. Information Report O-X-406 Ontario region. 109pp.
- Eriksson, K.E. 1988. Microbial delignification - Basics, potentials and applications Dans Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Aubert, J.P.; Beguin, P.; Millet, J.(Ed.) Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. p.285-302
- Fritz, C. W. 1954 Decay in poplar pulpwood in storage. *Can. J. Bot.* 32: 799 - 817.
- Godden, B., Ball, A.S., Helvenstein, P., McCarthy, A.J. et Penninckx, M.J. 1992. Towards the elucidation of the lignin degradation pathway in actinomycetes. *J. Gen. Micro.*138: 2441-2448.
- Goebel, B.M. et Stackebrandt, E. 1994. Cultural and Phylogenic Analysis of Mixed Microbial populations Found in Natural and Commercial Biobleaching Environments *Appl. Environ. Microbiol.* 60(5): 1614 - 1621.
- Gould, W.D., Béchard, G., Lortie, L. 1994. The Nature and Role of Microorganisms in the Tailings Environment. Dans: Short Course Handbook on Environmental Geochemistry of Sulfide Mine-Wastes. Mineralogical Association of Canada, Waterloo, Ontario. Jambor, J.L. et Blowes, D.W.(Eds). pp.185-199.
- Harrigan, W.F. et McCance, M.E. 1966. *Laboratory Methods in Microbiology.* Academic Press New York 362pp.
- Hendrickson, O. Q. 1991. Abundance and activity of N₂-fixing bacteria in decaying wood. *Can. J. Forest. Res.* 21: 1299 - 1304.
- Henningsson, B. 1967a Microbial decomposition of unpeeled birch and aspen pulpwood during storage. 32p. Royal College of Forestry, Stockholm, 32p.
- Henningsson, B. 1967b Physiology of fungi attacking birch and aspen pulpwood. Royal College of Forestry, Stockholm, 54p.
- Hinds, T.E. et Shepperd, W.D. 1987. Aspen Sucker Damage and Defect in Colorado Clearcut Areas. Research Paper - Rocky Mountain Forest and Range Experimental Station, USDA Forest Service No.

RM - 278 12pp.

Hirsch, C.F., Christensen, D.L. 1983. Novel method for Selective Isolation of Actinomycetes. Appl. Environ. Microbiol. 46(4) p. 925-929.

Holmer, L., Nitare, L. et Stenlid, J. 1994 Population structure and decay pattern of *Phellinus tremulae* in *Populus tremula* as determined by somatic incompatibility. Can J. Bot. 72: 1391 - 1396.

Holt, J.G. et Krieg, N.R. 1984. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. (Volume 1). Williams & Wilkins. Baltimore.

Holt, J.G., Sneath, P.H.A., Mair, N.S. et Sharpe, M.E. 1986 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Volume 2). Williams & Wilkins. Baltimore.

Holt, J.G., Stanley, J.T., Bryant, M.P. et Pfennig, N. 1989 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Volume 3). Williams & Wilkins. Baltimore.

Holt, J.G.; Williams, S.T.; Sharpe, M.E. 1989 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (Volume 4). Williams & Wilkins. Baltimore.

Hutchinson, L. J., Hiratsuka, Y. 1994. Some wood-inhabiting yeasts of trembling aspen (*Populus tremuloides*) from Alberta and northeastern British Columbia. Mycologia 86(3): 386 - 391

Ingold, C.T. 1984 The Biology of Fungi. 5th edition Hutchinson & Co. (Eds.) pp.150.

Jensen, M.A., Webster, J.A et Straus, N. 1993 Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. Appl. Environ. Microbiol. 59(4): 945-952.

Johnson, D.B., Ghauri, M.A. et Said, M.F. 1992. Isolation and Characterization of an Acidophilic, Heterotrophic Bacterium Capable of Oxidising Ferrous Iron. Appl. Environ. Microbiol. Vol 58(5): 1423-1428.

Khalid, A.M., Bhatti, T.M. et Umar, M. 1993. An improved solid medium for isolation, enumeration and genetic investigations of autotrophic iron and sulfur-oxidizing bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 259-263.

Kirk, T.K. 1988. Biochemistry of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium* Dans Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Aubert, J.P.; Beguin, P.; Millet, J.(Eds) Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich pp.315-332.

Kishimoto, N., Tano, T. 1987. Acidophilic heterotrophic bacteria isolated from acidic mine drainage, sewage and soils. J. Gen. Appl. Microbiol. 33: 11-25.

- Kleupfel, D. 1982. Biodegradation of cellulosic materials by *Streptomyces*. Dans: Séminaire France-Québec-États-Unis sur l'hydrolyse des matériaux ligno-celluloses: Compte-rendu. Montréal, (Québec). p.138-147
- Lamed, R.; Bayer, E.A. 1988. The Cellulosome Concept: Exocellular/Extracellular enzyme reactor centers for efficient binding and cellulolysis. Dans: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation. Aubert, J.P.; Beguin, P.; Millet, J.(Eds.) Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Toronto. pp.101-116
- Lynd, L.R.; Grethlein, H.E. et Wolkin, R.W. 1989. Fermentation of Cellulosic substrates in Batch and Continuous Culture by *Clostridium thermocellum*. Appl. Environ. Microbiol. 55(12): 3131-3139.
- Madden, R.H., Bryder, M.J., et Poole, N.J. 1982. Isolation and Characterisation of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium papyrosolvans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 32:87-91
- Mullins, E.J. et McKnight, T.S. 1981. Canadian Woods. University of Toronto Press. Toronto. pp. 389
- Muyzer, G., de Bruyn, A.C., Schmedding, D.J.M., Bos, P., Westbroek, P. et Keunen, G.J. 1987. A combined Immunofluorescence Staining Technique for Enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* in a Population of Acidophilic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 53(4): 660-664.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. et Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59(3): 695-700.
- Paul, E.A. et Clark, F.E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press Inc. Toronto 273pp.
- Petterson, R. 1984. The Chemical Composition of wood. Adv. Chem. 207: 57-126
- Petitdemange, E., Caillet, F., Giallo, J. et Gaudin, C. 1984. *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a Cellulolytic, Mesophilic Species from Decayed Grass. Int. J. Syst. Bacteriol. 34: 155-159
- Phelan, M. B., Crawford, D. L. et Pometto, A. L. III. 1979. Isolation of lignocellulose-decomposing actinomyces and degradation of specifically ¹⁴C-labelled lignocelluloses by six selected *Streptomyces* strains. Can. J. Microbiol. 25: 1270- 1276.
- Pizarro, J., Jedlicki, E., Orellana, O., Romero, J. et Espejo, R.T. 1996. Bacterial Populations in Samples as Revealed by Analysis of DNA Obtained before and after Cultivation. Appl. Environ. Microbiol. 62(4): 1323-1328.
- Pochon, J.; Tardieux, P. 1962. Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol. Éditions de la Tourelle.

- St-Mande, France 108pp.
- Prosser, J.I., Kilham, L.A., Glover, L.A. et Rattray E.A.S. 1996. Luminescence-Based Systems for Detection of Bacteria in the Environment. *Crit. Rev. Biotech.* 16(2): 157-183.
- Rayner, A.D.M. et Boddy, L. 1988. Fungal decomposition of wood : It's Biology and Ecology. John Wiley & Sons, New York. 587pp.
- Reid, I.D. 1995. Biodegradation of Lignin. *Can. J. Bot.* 73(Suppl. 1):S1011-S1018.
- Rodriguez, G.G., Phipps, D., Ishiguro, K. et Ridgeway, H.F. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualisation of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1801-1808.
- Rose, A.H.; Harrison, J.S. 1971. The Yeasts: Volume 2 Physiology and Biochemistry of Yeasts. Academic Press, New York, 571pp.
- Ross, W. D. 1976. Fungi associated with root diseases of aspen in Wyoming. *Can. J. Bot.* 54: 734 - 744.
- Schubert, W.J. 1965. Lignin Biochemistry. Academic Press, New York, 131pp.
- Sleat, R., Mah, R.A. et Robinson, R. 1984. Isolation and Characterization of an Anaerobic, Cellulolytic Bacterium, *Clostridium celluvorans* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(1):88-93.
- Southam, G. et Beveridge, T.J. 1992 Enumeration of Thiobacilli within pH-Neutral and Acidic Mine Tailings and Their Role in the Development of Secondary Mineral Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6): 1904-1912.
- Stoner, D.L., Browning, C.K., Bulmer, D.K., Ward, T.E. et MacDonell 1996. Direct 5S rRNA Assay for Monitoring Mixed-Culture Bioprocesses *Appl. Environ. Microbiol.* 62(6):1969-1976.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry 3e Edition, W.H. Freeman and Company, New York, 1089pp.
- Takeuchi, T.L. et Suzuki, I. 1994. Effect of pH on Sulfite Oxidation by *Thiobacillus thiooxidans* Cells with Sulfurous Acid or Sulfur Dioxide as a Possible Substrate. *J. Bacteriol.* 176(3): 913-916.
- Tassé N, Germain, D et Bergeron, M. 1992. Caractérisation Géochimique du parc de résidus miniers East-Sullivan. INRS-Georessources. (rapport non-publiée)
- Tassé N. et Germain, D. 1996. Qualité des Eaux Résiduelles au site East-Sullivan. Rapport final 251pp. Service du développement minier. Ministère des Ressources naturelles du Québec. 29 février 1996.

- Telang, A.J., Voorduow, G., Ebert, S., Sifeldeen, N., Foght, J.M., Fedorak, P.M. et Westlake, D.W.S. 1994. Characterisation of the diversity of sulfate-reducing bacteria in soil and mining waste water environments by nucleic acid hybridization techniques *Can. J. Microbiol.* 40: 955-964.
- Thomas, G. P., Etheridge, D. E., Paul, G. 1960. Fungi and Decay in Aspen and Balsam Poplar in the Boreal Forest Region, Alberta. *Can. J. Bot.* 38(4): 459-466.
- Trifonov, L.S. 1995. Bioactive metabolites from Antagonistics Aspen Fungi. Dans: Aspen Stain and Decay Workshop Proceedings. Canadian forest service and Land and Forest Service(Edmonton), p. 36-38
- Trifonov, L.S.; Chakravarty, P.; Hiratsuka, Y. et Ayer, W.A. 1992. Antifungal activity of metabolites of *Peniophora polygonia* against the aspen decay fungus *Phellinus tremulae*. *Eur J For Path* 22: 441-448.
- Tuttle, J. H., Dugan, P. R., Macmillanm C. B. et Randles, C. I. 1969. Microbial Dissimilatory Sulfur Cycle in Acid Mine Water. *J. Bact.* 97(2): 594 - 602.
- Walton, K C. et Johnson, D. B. 1992. Microbiological and chemical characteristics of an acidic stream draining a disused copper mine. *Env. Poll.* 76: 169 - 175.
- Wistreich, G.A. et Lechtman, M.D. 1988. *Microbiology*. Macmillan Publishing Company New York, 990pp.
- Whitney, R.D. 1995. Root-rotting fungi in white spruce, black spruce, and balsam fir in northern Ontario. *Can. J. Forest. Res.* 25: 1209 - 1230.
- Yang, J.C., Chynoweth, D.P., Williams, D.S. et Li, A. 1990. *Clostridium aldrichii* sp. nov., a Cellulolytic Mesophilic Inhabiting a Wood-Fermenting Anaerobic Digester. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40:268-272.
- Yanling, H., Youfanf, D. et Yanquan, L. 1991. Two Cellulolytic *Clostridium* Species: *Clostridium cellulosi* and *Clostridium cellulofermentans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:306-309.
- Zabel, R.A.; Morrell, J.J. 1992. *Wood Microbiology : Decay and it's Prevention*. Harcourt Brace Jovanovich(Eds) Academic Press, Inc., 476pp.

ANNEXE 1

Classification des microorganismes en fonction de leur métabolisme aérobie ou anaérobie

Aérobies	Anaérobies (facultatifs)
<p style="text-align: center;">BACTÉRIES</p> <p><i>Acidiphilium</i> spp.(16,18) <i>Bacillus</i>(13) <i>Enterobacter agglomerans</i>(17) <i>Enterobacter</i> sp.(17) <i>Thiobacillus thiooxidans</i>(15,16) <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>(15,16)</p> <p style="text-align: center;">MOISSISSURES</p> <p><i>Armillaria</i> sp.(1) <i>Armillaria mellea</i>(2,3,4,5) <i>Ascocoryne sarcoides</i>(6,12,21) <i>Coniophora puteana</i>(6,7,5,8) <i>Corticium polygomium</i>(2,3,5,11) <i>Cryptosphaeria populina</i>(9) <i>Cytospora chrysosperma</i>(1,4,9) <i>Hypoxyton mammatum</i>(1,10) <i>Peniophora polygonia</i>(1) <i>Phellinus pini</i>(5,6,7) <i>Phellinus tremulae</i>(3,5,19) <i>Phialemonium curvatum</i>(9) <i>Pholiota adiposa</i>(2,5,11) <i>Pholiota spectabilis</i>(2,11,5) <i>Polyporus adustus</i>(2,5,12) <i>Polyporus tomentosus</i>(6,7,5,8) <i>Radulum casearium</i>(2,3,5,11) <i>Scytinostroma galactina</i>(5,6,7,8) <i>Stachybotrys cylindrospora</i>(9) <i>Stereum purpureum</i>(3,5,12)</p> <p style="text-align: center;">ACTINOMYCETES</p> <p><i>Streptomyces</i> spp.(13) <i>Streptomyces flavogriseus</i>(14)</p> <p style="text-align: center;">LEVURES</p> <p><i>Candida ernobii</i>(22) <i>Cyrtococcus laurentii</i>(22) <i>Cryptococcus skinneri</i>(22) <i>Phaeococcomyces nigricans</i>(22) <i>Pichea minuta</i> var. <i>minuta</i>(22) <i>Pichea stipitis</i>(22) <i>Rhodotorula minuta</i>(22) <i>Sporidiobolus salmonicolor</i>(22)</p>	<p style="text-align: center;">BACTÉRIES</p> <p><i>Bacillus</i>(fac)(13) <i>Clostridium</i>(13) <i>Clostridium thermocellum</i>(20) <i>Enterobacter</i> sp.(17) <i>Enterobacter agglomerans</i>(17) <i>Desulfotomaculum</i>(13) <i>Desulfovibrio</i>(13)</p> <p style="text-align: center;">LEVURES</p> <p><i>Candida ernobii</i> <i>Cyrtococcus laurentii</i> <i>Cryptococcus skinneri</i> <i>Phaeococcomyces nigricans</i> <i>Pichea minuta</i> var. <i>minuta</i> <i>Pichea stipitis</i> <i>Rhodotorula minuta</i> <i>Rhodotorula minuta</i> <i>Sporidiobolus salmonicolor</i></p>

1-Hinds et Shepperd, 1987, 2-Thomas et al., 3-Fritz, 1954, 4-Ross, 1976, 5-Basham et Morawski, 1964, 6-Whitney, 1995, 7-Basham, 1972, 8-Davidson et Redmond, 1957, 9-Crane et al., 1996, 10-Crane, 96, 11-Basham, 1958, 12-Henningsson, 1967, 13-Tuttle et al., 1969, 14-Kluepfel, 1981, 15-Walton et Johnson, 1992, 16-Davis et al., 1995, 17-Buckley et Triska, 1978, 18-Kishimoto et Tano, 1987, 19-Holmer et al., 1994, 20-Lamed et Bayer, 1992, 21-Basham, 1973, 22-Hutchison et Hiratsuka, 1994

ANNEXE 2

Microorganismes qui peuvent dégrader la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Organisme	Cellulose	Hémicellulose	Lignine
CHAMPIGNON-MOISSISSURES			
<i>Armillaria sp.</i> (1)	X	X	X
<i>Armillaria mellea</i> (2,3,4,5,6)	X	X	X
<i>Coniophora puteana</i> (7,8,5,9,6)	X	X	
<i>Cryptosphaeria populina</i> (10)	X	X	
<i>Cytospora chrysosperma</i> (10,1,4)	X	X	
<i>Hypoxylon mammatum</i> (11,1)	X	X	
<i>Phellinus pini</i> (5,6,7,8, 10)	X	X	X
<i>Phialemonium curvatum</i> (10)	X	X	
<i>Pholiota adiposa</i> (2,5,12)	X	X	X
<i>Pholiota spectabilis</i> (2,5,12)	X	X	
<i>Polyporus adustus</i> (2,5,13)	X	X	
<i>Polyporus tomentosus</i> (5,7,8,9)	X	X	X
<i>Scytinostroma galactina</i> (5,6,7,8,9)	X	X	X
<i>Stereum purpureum</i> (3,5,13)	X	X	X
<i>Stachbotrys cylindrospora</i> (10)	X	X	
ACTINOMYCÈTES			
<i>Streptomyces spp.</i> (14)	X	X	X
<i>Streptomyces badius</i> (15)	X	X	X
<i>Streptomyces flavogriseus</i> (16)	X	X	
<i>Streptomyces setonii</i> (17)	X	X	X
<i>Streptomyces viridosporus</i> (17)	X	X	X
BACTÉRIES			
<i>Bacillus</i> (14, 27)		X	
<i>Clostridium</i> (14, 18, 19, 20)	X		
<i>Clostridium cellulovorans</i> (21)	X		
<i>Clostridium papyrosolvans</i> (22)	X		
<i>Clostridium cellulolyticum</i> (23)	X		
<i>Clostridium thermocellum</i> (24)	X		
<i>Clostridium aldrichii</i> (25)	X		
<i>Clostridium cellulosi</i> (26)	X		
<i>Clostridium cellulofermentans</i> (26)	X		

1-Hinds et Shepperd, 1987, 2-Thomas et al., 1960, 3-Fritz, 1954, 4-Ross, 1976, 5-Basham et Morawski, 1964, 6-Davis et Myren, 1987, 7-Whitney, 1995, 8-Basham, 1972, 9-Davidson et Redmond, 1957, 10-Crane et al., 1996, 11-Crane, 96, 12-Basham, 1958, 13-Henningsson, 1967a, 14-Tuttle et al., 1969, 15-Phelan et al., 1976, 16-Kluepfel, 1981, 17-Antai et Crawford, 1981, 18-Sleat et al., 1984, 19-Lynd et al., 1989, 20-Lamed et Bayer, 1988, 21-Sleat et al., 1984, 22-Madden et al., 1982, 23-Petitdemange et al., 1982, 24-Lynd et al., 1989, 25-Yang et al., 1990, 26-Yanling et al., 1991, 27-Atlas et Bertha, 1981.

ANNEXE 3

Sensibilité au pH des microorganismes

Microorganisme	1.0 - 3.5	3.6 - 5.5	5.6 et plus
BACTÉRIES			
<i>Acidiphilium</i> (3,4)	X	X	X
<i>Bacillus</i> (1)	X	X	X
<i>Clostridium</i>			X
<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2, 3)	X	X	X
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (2, 3)	X	X	X
ACTINOMYCETES			
<i>Streptomyces</i> (1)	X	X	X
MOISSISSURES			
<i>Polyporus adustus</i> (5)	X	X	X
<i>Stéreau purpureum</i> (5)	X	X	X
Autres(6)	X	X	X

1-Tuttle et al., 1969, 2-Walton et Johnson, 1992, 3-Davis et al., 1995, 4-Kishimoto et Tano, 1987, 5-Henningsson, 1967b, 6-Ingold, 1984

ANNEXE 4

Microorganismes qui peuvent dégrader le soufre et le fer

Microorganisme	Soufre	Fer
<i>Desulfotomaculum</i> (1)	X	
<i>Desulfovibrio</i> (1)	X	
<i>Leptospirillum thiooxidans</i> (2,3)	X	X
<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2,3)	X	
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (2,3)	X	X

1-Tuttle et al., 1969, 2-Walton et Johnson, 1992, 3-Davis et al., 1995

ANNEXE 5

Sensibilité à la température des microorganismes.

Organisme	9°C et moins	10-19°C	20-29°C	30-39°C	40-49°C
BACTÉRIES					
<i>Acidiphilium</i> (associé avec <i>T ferroxidans</i>)(3,5)			X	X	X
<i>Bacillus</i> (1)	X	X	X	X	X
<i>Clostridium</i> (1)		X	X	X	
<i>Desulfotomaculum</i> (1)		X	X	X	
<i>Desulfovibrio</i> (1)	X	X	X	X	X
<i>Enterobactor</i> sp.(4)			X	X	
<i>Enterobactor agglomerans</i> (4)			X	X	
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i> (7)			X	X	
<i>Thiobacillus thiooxidans</i> (2,3)	X	X	X	X	
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> (2,3)		X	X	X	X
ACTINOMYCETES					
<i>Streptomyces</i> (1)	X	X	X	X	X
Autres	X	X	X	X	X
MOISSISSURES					
<i>Polyporus adustus</i> (5)	X	X	X	X	
<i>Stereum purpureum</i> (5)	X	X	X	X	
autres(6)	X	X	X	X	X

1-Tuttle et al., 1969, 2-Walton et Johnson, 1992, 3-Davis et al., 1995, 4-Buckley et Triska, 1978, 5-Kishimoto et Tano, 1987, 6-Ingold, 1984, Holt et al., 1989

8341.0246 **Résidus forestiers**
East Sullivan - Suivi et entretien - Résidus forestiers -
Canton Bourlamaque - Rg V et VI - CM 344 - SNRC
032C-04 Site 64

Vol.
A

Unité 1672A

Réf. 478973