



**HAL**  
open science

# Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué

Christine Bidaud

► **To cite this version:**

Christine Bidaud. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 1998. Français. NNT : 1998INPG4205 . tel-00841329

**HAL Id: tel-00841329**

**<https://theses.hal.science/tel-00841329>**

Submitted on 4 Jul 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE  
DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE GRENOBLE**

**n° d'ordre : 188 CD**

**THESE**

**présentée par**

**Christine BIDAUD**

**pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR en Génie des Procédés**

**DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE ET DE L'ECOLE NATIONALE  
SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

**BIODEGRADATION DES  
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES  
Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un Sol  
Pollué  
soutenu le 29 juin 1998**

**Président du Jury : Robert PERRAUD, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble**

**Rapporteurs : Gilbert MILLE, Professeur, Université d'Aix-Marseille  
Michel SCHIAVON, Professeur, ENSAIA, Nancy**

**Membres du Jury : Véronique CROZE, Chef de Travaux, ICF Environnement  
Alain ROS, Docteur en Médecine, C.H.U. Saint-Etienne  
Michel SOUSTELLE, Professeur, ENSMSE  
Canh TRAN-MINH, Maître de Recherches, ENSMSE**



**ECOLE NATIONALE SUPERIEURE  
DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

**INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE  
DE GRENOBLE**

**n° d'ordre : 188 CD**

**THESE**

**présentée par**

**Christine BIDAUD**

**pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR en Génie des Procédés**

**DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE GRENOBLE ET DE L'ECOLE NATIONALE  
SUPERIEURE DES MINES DE SAINT-ETIENNE**

**BIODEGRADATION DES  
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES  
Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un Sol  
Pollué  
soutenue le 29 juin 1998**

**Président du Jury : Robert PERRAUD, Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble**

**Rapporteurs : Gilbert MILLE, Professeur, Université d'Aix-Marseille  
Michel SCHIAVON, Professeur, ENSAIA, Nancy**

**Membres du Jury : Véronique CROZE, Chef de Travaux, ICF Environnement  
Alain ROS, Docteur en Médecine, C.H.U. Saint-Etienne  
Michel SOUSTELLE, Professeur, ENSMSE  
Canh TRAN-MINH, Maître de Recherches, ENSMSE**



## RESUME

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules qui posent un grave problème environnemental à cause de leurs propriétés toxiques, cancérigènes, voire tératogènes.

Les sites d'anciennes usines à gaz ou les mines sont souvent pollués par ces produits issus de la combustion incomplète de matières organiques.

Notre travail a été réalisé à partir d'échantillons de sol issus d'un site d'ancienne usine à gaz contaminé par des HAP. Une dépollution biologique sur terres excavées, sur le site, devait débiter quand ce travail de thèse a commencé.

Nous avons d'abord étudié la biodégradabilité naturelle des 16 HAP ciblés par l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (U.S. E.P.A.) à partir d'échantillons de sol prélevés sur le site.

Pour cela, nous avons étudié leur biodégradabilité pour différents paramètres environnementaux : humidité du sol, pH du sol, aération (par addition ou non de sciure) et température.

Nous avons ainsi mis en évidence une biodégradation naturelle pouvant atteindre 90% pour les HAP de 2 à 4 cycles, alors que les HAP de 5 et 6 cycles sont peu ou pas biodégradés. Les variations des différents paramètres environnementaux ont une influence sur la cinétique de dégradation des HAP étudiés, mais pas sur les teneurs finales des HAP (équilibre non déplacé).

Nous avons également procédé à la sélection en batch de micro-organismes, issus du sol pollué échantillonné, capables de croître sur différents HAP de 3 et 4 cycles (fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène) comme seule source de carbone.

Quatre consortia de micro-organismes (des bactéries) se sont révélés intéressants pour leur versatilité d'utilisation des HAP et leurs capacités de dégradation. Les souches impliquées dans ces consortia ont été identifiées par des méthodes classiques de microbiologie.

Leur croissance sur les HAP (cristaux) semble limitée par des phénomènes de transfert vers la phase aqueuse. L'addition de surfactant pour augmenter la solubilité apparente et la disponibilité des HAP dans le milieu a des effets variés et contradictoires en fonction des HAP et des consortia.

Des métabolites, non identifiés, de la dégradation des HAP par les micro-organismes ont été mis en évidence dans les surnageants de culture, ce qui semble indiquer que la dégradation des HAP par les micro-organismes sélectionnés est partielle.

Nous avons ensuite étudié la dégradation des 16 HAP cibles dans des microcosmes de sol pollué inoculés avec les consortia sélectionnés.

Les premiers essais ont été réalisés sur un sol stérilisé par autoclavage dans le but d'évaluer les capacités propres des 4 consortia à dégrader des HAP dans une matrice complexe. Seule la dégradation des HAP de 3 et 4 cycles a pu ainsi être mise en évidence.

Les essais suivants ont été réalisés dans des microcosmes de sol non stérile (naturel) inoculés avec 2 consortia dans le but d'évaluer leur comportement dans un environnement déjà peuplé de micro-organismes et leur apport en inoculation d'un sol réel. Ils accélèrent le processus de biodégradation, mais ne réduisent pas les teneurs finales en HAP.



# SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE .....	1
-----------------------------	---

## BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I : LES MICRO-ORGANISMES DES SOLS .....	5
--	---

I.1 - CLASSIFICATION RAPIDE .....	5
I.2 - BACTÉRIES, ACTINOMYCETES, CHAMPIGNONS ET ALGUES .....	6
I.2.1 – Bactéries .....	6
I.2.2 – Actinomycètes .....	6
I.2.3 – Champignons .....	6
I.2.4 – Algues .....	7
I.2.5 - Répartition dans les sols .....	7
I.3 - ACTIVITÉS MICROBIENNES DANS LES SOLS .....	7
I.3.1 - Facteurs physico-chimiques .....	8
I.3.2 - Influence de la texture et de la structure du sol .....	13
I.3.3 - Interactions entre micro-organismes .....	14
I.4 - LES PROCESSUS GÉNÉRAUX DE BIODÉGRADATION .....	15
I.4.1 - L'adaptation à la dégradation des xénobiotiques .....	15
I.4.2 - Les principaux processus de transformation .....	18
I.4.3 - Les relations entre les communautés microbiennes : optimisation des interactions microbiennes pour la biodégradation.....	19

CHAPITRE II : PHYSICO-CHIMIE DE L'INTERACTION SOL-POLLUANT .....	23
--	----

II.1 - INFLUENCE DE LA STRUCTURE DE LA MOLÉCULE ET DES LIAISONS MISES EN JEU SUR L'ADSORPTION .....	24
II.1.1 - Le volume moléculaire .....	24
II.1.2 - L'hydrophobie .....	24
II.1.3 - L'ionisation .....	25
II.1.4 - Les liaisons hydrogène.....	25
II.1.5 - L'arrangement et les interactions dans la molécule.....	25
II.1.6 - La coordination.....	26
II.2 - ESTIMATION DES COEFFICIENTS D'ADSORPTION.....	26
II.3 - LA MOBILITÉ DES MOLÉCULES ORGANIQUES DANS LE SOL .....	28
II.3.1 - L'équation de retardation .....	28
II.3.2 - Le modèle de mobilité convective .....	29
II.4 - LA NATURE DE LA SOLUTION DE SOL .....	29
II.4.1 - Sa composition .....	29
II.4.2 - Sa température .....	29
II.4.3 - Son pH.....	30
II.4.4 - Sa teneur en eau.....	30



II.5 - LA NATURE DE LA MATRICE SOLIDE : LES MINÉRAUX ET LA MATIÈRE ORGANIQUE.....	30
II.5.1 - Les argiles.....	30
II.5.2 - Les oxydes et les hydroxydes cristallins.....	31
II.5.3 - Les oxydes et les hydroxydes amorphes.....	31
II.5.4 - Les carbonates.....	31
II.5.5 - Les constituants organiques.....	31
II.5.6 - La structure du sol.....	32

### **CHAPITRE III : LA POLLUTION DES SITES D'ANCIENNES USINES A GAZ ET LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES.....33**

III.1 - LES ORIGINES DE LA POLLUTION.....	33
III.2 - CARACTÉRISATION DE LA POLLUTION SUR LES SITES D'ANCIENNES USINES À GAZ .....	34
III.2.1 - Les goudrons.....	34
III.2.2 - Les autres pollutions.....	35
III.3 - POPULATION MICROBIENNE.....	35
III.4 - LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES : CARACTÉRISTIQUES, BIODÉGRADATION .....	36
III.4.1 - Structure et propriétés physico-chimiques .....	36
III.4.2 - Mécanismes de rétention dans les sols/sédiments .....	38
III.4.3 - Existence dans les sols de populations microbiennes naturellement adaptées à la biodégradation des HAP.....	39
III.5 - LA BIODÉGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES .....	40
III.5.1 - Schéma de la dégradation dans les sols : exemple du naphthalène.....	40
III.5.2 - Mise en évidence de la biodégradation au laboratoire .....	41
III.5.3 - Voies de dégradation des HAP par les micro-organismes.....	47
III.5.4 - Evaluation de la toxicité des HAP et de leurs produits de dégradation.....	53
III.5.5 - Effet de l'addition de surfactants sur la biodégradation des HAP.....	54

## **MATERIELS ET METHODES**

### **CHAPITRE IV : MATERIELS ET METHODES .....57**

IV.1 - PROTOCOLES DE CARACTÉRISATION DU SOL ET DE LA POLLUTION .....	57
IV.1.1 - Préparation et stockage de l'échantillon.....	57
IV.1.2 - Caractérisation physico-chimique.....	57
IV.1.3 - Caractérisation microbiologique du sol (méthode de dénombrement) .....	58
IV.1.4 - Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les sols.....	59
IV.2 - DÉGRADATION NATURELLE DES HAP EN MICROCOSMES DE SOL .....	60
IV.2.1 - Dispositif expérimental.....	61
IV.2.2 - Première série : 20% d'humidité, pH=7,2, avec ou sans 30% (w/w) de sciure, 23°C.....	61

IV.2.3 - Deuxième série : 27% d'humidité, pH=7,2 ou 5,3, avec ou sans 30% (w/w) de sciure, 23°C .....	61
IV.2.4 - 20% d'humidité, pH=7,2, 23° ou 30°C.....	62
IV.3 - SÉLECTION ET ÉTUDE DE MICRO-ORGANISMES DÉGRADANT DES HAP .....	62
IV.3.1 - Protocole de sélection et mise en évidence des micro-organismes .....	62
IV.3.2 - Etude de la croissance sur différentes sources carbonées.....	63
IV.4 - ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES COMPOSANT LES CONSORTIA .....	65
IV.4.1 - Composition des consortia.....	65
IV.4.2 - Isolement et identification.....	66
IV.5 - INOCULATION DE MICROCOSMES DE SOL POLLUÉ AVEC LES CONSORTIA PT, AT, FT ET PY .....	70
IV.5.1 - Sol stérilisé par autoclavage, inoculé avec les consortia à 23°C.....	70
IV.5.2 - Sol stérilisé ou non par autoclavage, inoculé avec les consortia à 30°C.....	71

## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>CHAPITRE V : ETUDE DE LA BIODEGRADATION NATURELLE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) EN MICROCOSMES DE SOL - INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX .....</b>	<b>73</b>
V.1 - CARACTÉRISATION DU SOL UTILISÉ .....	73
V.1.1 - Caractérisation physico-chimique.....	73
V.1.2 - Caractérisation de la pollution par les HAP.....	75
V.1.3 - Caractérisation microbiologique .....	77
V.2 - ÉTUDE DE LA BIODÉGRADATION NATURELLE À 23°C EN MICROCOSMES DE SOL.....	77
V.2.1 - Evolution de la population microbienne .....	80
V.2.2 - Dégradation globale des HAP.....	82
V.2.3 - Dégradation par famille de HAP .....	85
V.2.4 - Calcul des demi-vies.....	95
V.3 - EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA BIODÉGRADATION NATURELLE EN MICROCOSMES DE SOL.....	96
V.3.1 - Evolution de la population microbienne .....	97
V.3.2 - Dégradation globale des HAP.....	98
V.3.3 - Dégradation par famille de HAP .....	99
V.3.4 - Calcul des demi-vies.....	103
V.4 - CONCLUSION SUR L'INFLUENCE DES PARAMÈTRES ENVIRONNEMENTAUX .....	104

**CHAPITRE VI : SELECTION EN BATCH ET IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES UTILISANT DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) COMME SEULE SOURCE CARBONÉE.....107**

VI.1 – SÉLECTION EN BATCH .....	107
VI.1.1 – <i>Choix des HAP cibles</i> .....	107
VI.1.2 – <i>Mise en évidence de la sélection</i> .....	107
VI.1.3 – <i>Bilan</i> .....	110
VI.2 – IDENTIFICATION DES MICRO-ORGANISMES CONSTITUANT LES CONSORTIA FT, PT, PY ET AT.....	111
VI.2.1 – <i>Aspect des cultures sur lame</i> .....	112
VI.2.2 – <i>Vérification de la présence de bactéries uniquement</i> .....	112
VI.2.3 – <i>Identification bactérienne</i> .....	113
VI.2.4 – <i>Cohérence des identifications et possibilités de risques</i> .....	120
VI.2.5 – <i>Bilan sur les identifications</i> .....	122

**CHAPITRE VII : ETUDE EN BATCH DES CONSORTIA SUR DIFFERENTES SOURCES CARBONÉES.....125**

VII.1 – PREMIÈRE EXPOSITION AUX SOURCES CARBONÉES.....	125
VII.1.1 – <i>Croissance</i> .....	125
VII.1.2 – <i>Aspect des cultures de PT, AT, FT et PY</i> .....	128
VII.1.3 – <i>Spectres d'absorption UV-visible au bout de 140 jours de culture</i> .....	129
VII.1.4 – <i>Observation des cultures au microscope optique</i> .....	132
VII.1.5 – <i>Bilan</i> .....	133
VII.2 – SUIVI DE L'UTILISATION DES HAP PAR SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION DE FLUORESCENCE .....	136
VII.2.1 – <i>Spectres d'émission de fluorescence caractéristiques des HAP étudiés</i> .....	136
VII.2.2 – <i>Dégradation du phénanthrène</i> .....	137
VII.2.3 – <i>Dégradation de l'anthracène</i> .....	138
VII.2.4 – <i>Dégradation du fluoranthène</i> .....	139
VII.2.5 – <i>Dégradation du pyrène</i> .....	141
VII.2.6 – <i>Bilan</i> .....	142
VII.3 – DEUXIÈME EXPOSITION AUX SOURCES CARBONÉES.....	143
VII.3.1 – <i>Phénanthrène</i> .....	144
VII.3.2 – <i>Anthracène</i> .....	145
VII.3.3 – <i>Fluoranthène</i> .....	147
VII.3.4 – <i>Pyrène</i> .....	149
VII.3.5 – <i>Fluorène</i> .....	150
VII.3.6 – <i>Bilan</i> .....	151
VII.4 – EFFET DE L' ADDITION DE SURFACTANT .....	152
VII.4.1 – <i>Croissance de PT sur le phénanthrène</i> .....	153
VII.4.2 – <i>Croissance de AT sur l'anthracène</i> .....	154
VII.4.3 – <i>Croissance de FT sur le fluoranthène</i> .....	154
VII.4.4 – <i>Croissance de PY sur le pyrène</i> .....	155
VII.4.5 – <i>Bilan</i> .....	156

VII.5 – EFFET DE LA QUANTITÉ DE CRISTAUX PRÉSENTE .....	157
VII.5.1 – PT sur le phénanthrène.....	157
VII.5.2 – AT sur l'anthracène .....	158
VII.5.3 – FT sur le fluoranthène .....	159
VII.5.4 – PY sur le pyrène.....	160
VII.5.5 – Bilan.....	161
VII.6 – MISE EN ÉVIDENCE DES COMPOSÉS PRODUITS AU COURS DE L'UTILISATION DU FLUORANTHÈNE, DU PHÉNANTHRÈNE, DU PYRÈNE ET DE L'ANTHRACÈNE PAR LES CONSORTIA FT, PT, PY ET AT. ....	161
VII.6.1 – A partir du fluoranthène .....	162
VII.6.2 – A partir du phénanthrène.....	165
VII.6.3 – A partir du pyrène.....	166
VII.6.4 – A partir de l'anthracène .....	169
VII.6.5 – A partir du fluorène .....	170
VII.6.6 – Bilan.....	173
<b>CHAPITRE VIII : DEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) PAR LES CONSORTIA EN MICROCOSMES DE SOL .....</b>	<b>175</b>
VIII.1 – INOCULATION DE MICROCOSMES DE SOL STÉRILE À 23°C ET 30°C .....	176
VIII.1.1 – Effet de la quantité d'inoculum sur la biodégradation à 23°C .....	176
VIII.1.2 – Biodégradation des HAP à 23°C et 30°C dans les microcosmes de sol stérile inoculés avec les consortia PT, AT, FT et PY.....	181
VIII.1.3 – Bilan .....	201
VIII.2 – INOCULATION DE MICROCOSMES DE SOL NON STÉRILE À 30°C.....	202
VIII.2.1 – Dénombrements sur géloses.....	203
VIII.2.2 – Dégradation globale des HAP non cancérigènes et cancérigènes.....	205
VIII.2.3 – Biodégradation par famille de HAP.....	206
VIII.2.4 - Bilan .....	213
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>215</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>219</b>
<b>ANNEXES</b>	



# **INTRODUCTION GENERALE**



Une pollution est définie comme une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes ou l'environnement.

En 1994, date à laquelle ce travail a commencé, 669 sites pollués ont été recensés en France par le Ministère de l'Environnement (Ministère de l'Environnement, 1994).

Parmi ces 669 sites, la nature de la pollution de 431 sites était identifiée, 66 de ces sites étant pollués par des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

Les HAP posent un problème environnemental dans la mesure où ils ont des propriétés toxiques, cancérogènes, voire même tératogènes.

Ils sont présents dans les combustibles fossiles et sont formés au cours de la combustion incomplète de matière organique.

Les HAP sont des composés hydrophobes et leur persistance dans les écosystèmes est due principalement à leur faible solubilité aqueuse. Ils ont tendance à s'adsorber sur les sols et les sédiments à cause de leur caractère hydrophobe.

L'hydrophobie, la persistance environnementale et la génotoxicité augmentent avec la taille des HAP. Les problèmes de toxicité vont de la toxicité chronique à la cancérogénèse.

Le devenir possible des HAP dans l'environnement inclut la volatilisation, la photooxydation, l'oxydation chimique, la bioaccumulation, l'adsorption aux particules de sol, la lixiviation et la dégradation microbienne.

Des études récentes ont montré que la dégradation microbienne des HAP est le processus principal de décontamination des sédiments et des sols de surface.

Ces composés peuvent être minéralisés ou partiellement transformés, soit par une communauté de micro-organismes, soit par un micro-organisme particulier.

Les techniques d'extraction par dégazage sous vide ou par pompage, sont peu efficaces sur les sols contaminés par les HAP à cause des propriétés physico-chimiques de ces composés. Aussi, la biorémédiation des sols contaminés par les HAP est un moyen alternatif de détoxification qui peut remplacer les méthodes traditionnelles comme l'incinération.

La dépollution biologique est un moyen plus doux et naturel puisqu'il s'agit d'exploiter les capacités de la nature.

Aussi, le problème environnemental des HAP couplé à l'intérêt de leur biodégradation nous a conduits à entrer en contact avec la société ICF Environnement qui a travaillé notamment sur le Grand Stade de France et était intéressée par des recherches concernant les HAP et les processus de dépollution biologique.

Cette société a ainsi mis à notre disposition des échantillons de sol prélevés sur un site d'ancienne usine à gaz contaminé par des HAP, site dont la biorémédiation a été initiée simultanément à nos travaux.

Le but de notre travail était donc d'étudier des paramètres environnementaux intervenant dans le processus de dépollution pour évaluer leur influence sur l'efficacité de la biorémédiation (vitesse de dégradation et teneurs finales des HAP) naturelle par la microflore indigène du sol.



Une méthode souvent préconisée dans la littérature pour améliorer la biodégradation est l'inoculation du sol pollué avec des micro-organismes adaptés à la dégradation. Aussi, nous avons sélectionné en batch des bactéries à partir de la microflore indigène du sol en raison de leur capacité à utiliser des HAP de 3 et 4 cycles comme seule source de carbone. Il est intéressant de travailler avec des micro-organismes indigènes car des souches exogènes ont souvent plus de difficultés à s'adapter à l'environnement du sol quand elles y sont inoculées.

Nous avons utilisé des HAP de 3 et 4 cycles car ils sont biodégradés naturellement dans le sol, ce qui n'est pas le cas des HAP plus gros : nous avons donc davantage de chances de réussir la sélection, ce qui nous a permis de mettre au point le protocole de sélection. Nous espérons en outre que ces micro-organismes seraient capables de dégrader les HAP plus gros, soit directement, soit par cométabolisme.

Nous avons ensuite étudié les capacités de dégradation de ces micro-organismes en batch, puis en microcosmes de sol.

**La partie bibliographique** comporte trois chapitres. Le premier chapitre (**I**) concerne les micro-organismes présents dans le sol, leur nature, l'influence des facteurs physico-chimiques sur leur activité, les phénomènes d'adaptation à la dégradation des xénobiotiques et les interactions possibles entre micro-organismes.

Le deuxième chapitre (**II**) concerne l'interaction entre le sol et les polluants. Elle est fonction de la molécule polluante, de la nature du sol et se traduit en termes de coefficients d'adsorption et de mobilité de la molécule organique.

Le troisième chapitre (**III**) de la bibliographie concerne la pollution des sites d'anciennes usines à gaz, en particulier par les HAP, les caractéristiques physico-chimiques des HAP et leur biodégradation.

La deuxième partie, **Matériels et Méthodes**, qui correspond au quatrième chapitre (**IV**), expose les protocoles utilisés dans notre travail.

La troisième partie, **Résultats et Discussion**, comporte 4 chapitres.

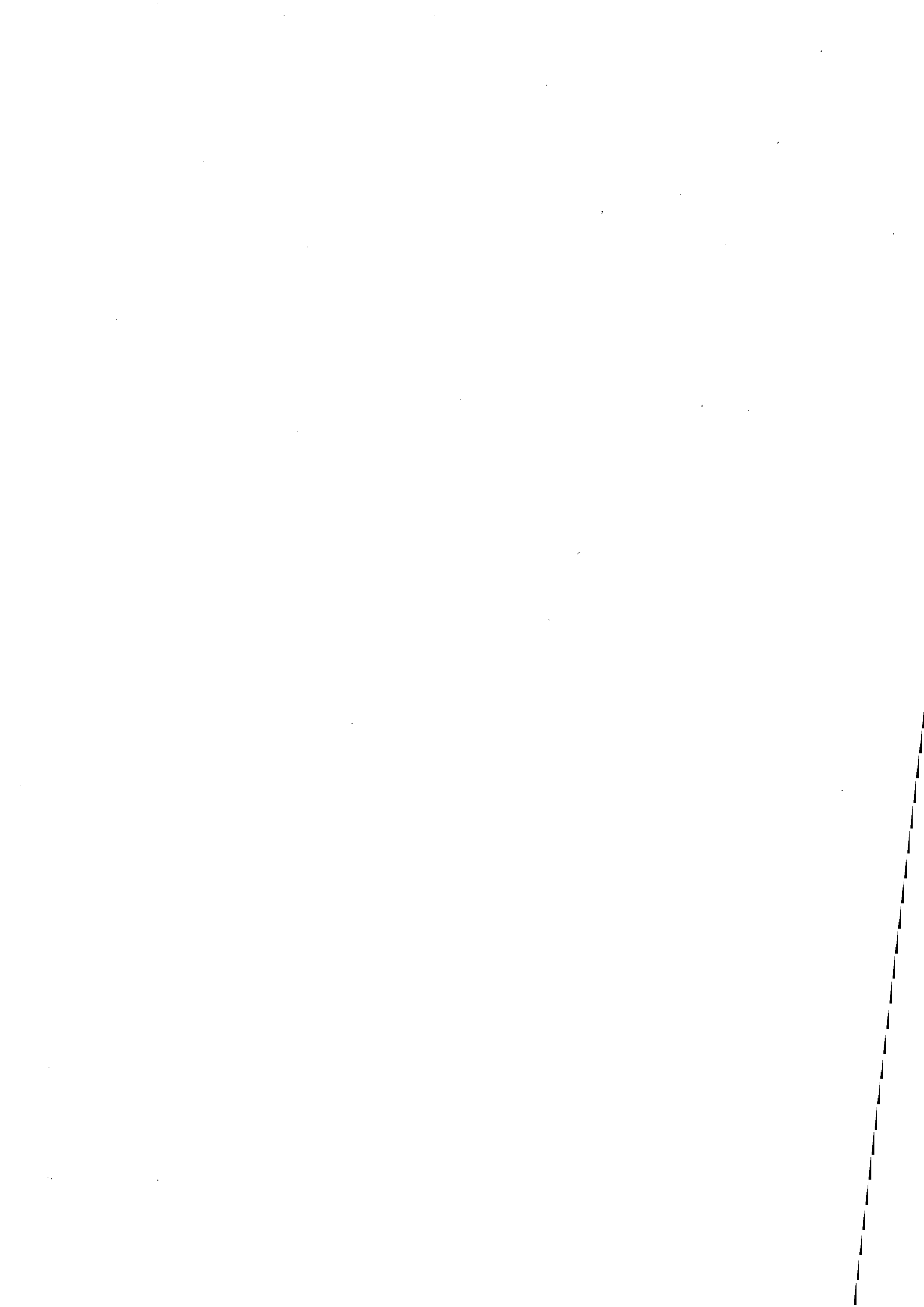
Le chapitre **V** traite de la biodégradation naturelle des HAP en microcosmes de sol en fonction de différents paramètres environnementaux (humidité, pH, aération, température). Cela permet de déterminer les HAP biodégradables, leur taux et leur vitesse de dégradation en fonction des paramètres physico-chimiques étudiés.

Le chapitre **VI** concerne la sélection et l'identification des bactéries (consortia) capables d'utiliser des HAP de 3 et 4 cycles comme seule source carbonée.

Le chapitre **VII** présente l'étude de la croissance de ces consortia sur différents HAP, de la dégradation des HAP, de l'influence de l'addition d'un surfactant (Tween 80) sur l'utilisation des HAP par ces consortia, et des métabolites de la dégradation des HAP.

Enfin, le dernier chapitre (**VIII**) s'intéresse d'abord à l'inoculation des consortia sélectionnés dans des microcosmes de sol stérilisé pollué par des HAP pour déterminer leurs

capacités de dégradation des HAP dans un sol. Ensuite, il présente les résultats de l'inoculation de sol pollué non stérile avec deux consortia sélectionnés pour évaluer l'effet que peut avoir l'inoculation avec ces micro-organismes sur la biodégradation naturelle (vitesse et teneurs finales) des HAP dans le sol.



# **BIBLIOGRAPHIE**



## CHAPITRE I : LES MICRO-ORGANISMES DES SOLS

Les organismes du sol appartiennent, d'une part à tous les groupes connus de micro-organismes (bactéries, actinomycètes, champignons, algues, protozoaires) (Alexander, 1977 ; Paul and Clark, 1989), et d'autre part à certains groupes d'animaux, essentiellement des nématodes, des annélides et des arthropodes (Paul and Clark, 1989). La Figure I-a illustre cette diversité et souligne les interactions et les relations trophiques qui existent dans ce milieu. Les plantes n'interviennent pas seulement comme source ou apport d'énergie, mais aussi comme organisme interagissant avec les micro-organismes.

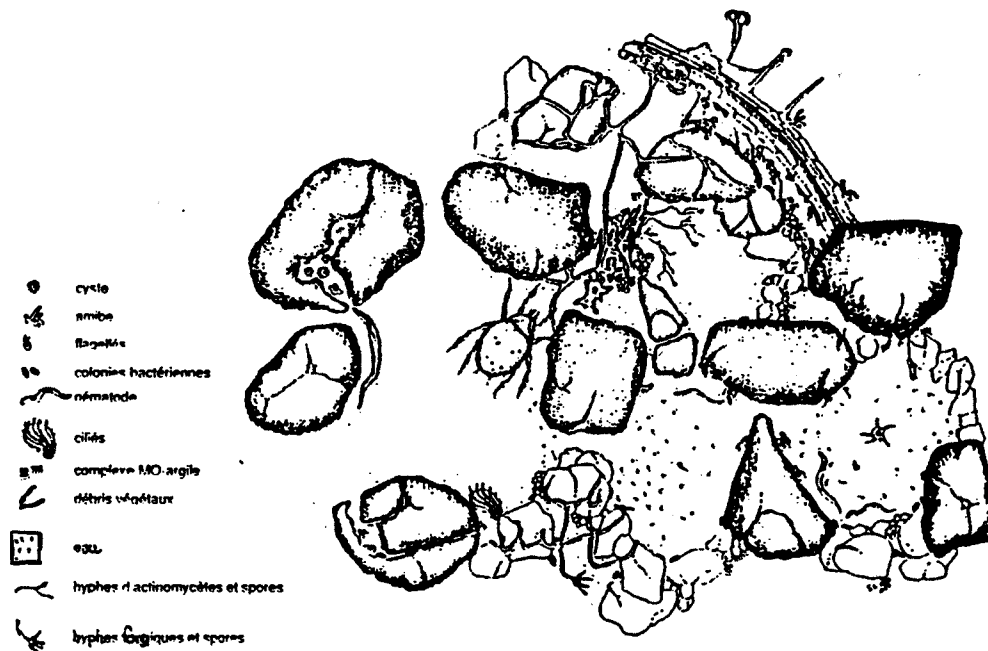


Figure I-a : Les différents groupes d'organismes présents dans 1cm<sup>2</sup> d'un horizon de surface d'un sol de prairie (Paul and Clark, 1989).

### I.1 - Classification rapide

Les micro-organismes constituent, indépendamment des animaux et des végétaux, un troisième groupe d'organismes, les protistes. Ils sont unicellulaires ou multicellulaires, mais ne présentent pas de différenciation en tissus et organes. Ils comprennent 2 groupes : les protistes inférieurs ou procaryotes et les protistes supérieurs ou eucaryotes.

Les procaryotes sont dépourvus de véritable noyau et contiennent une molécule simple d'ADN souvent circulaire. Ils comprennent les bactéries, les actinomycètes (bactéries filamenteuses) et les Cyanophycées (algues bleu-vert).

Les eucaryotes possèdent un noyau pourvu d'une membrane nucléaire et des chromosomes. Ce sont les champignons, les algues, les protozoaires, ces deux derniers groupes représentant une biomasse moins importante dans le sol (Tableau I.1-a).

Organismes	Nombre (UFC/g de sol sec)
BACTERIES	$10^8$
ACTINOMYCETES	$10^5$ à $10^6$
CHAMPIGNONS	$10^5$
ALGUES	$10^4$ à $10^5$
PROTOZOAIRES	$10^4$

**Tableau I.1-a :** Abondance des micro-organismes dans les sols (Bonneau et Souchier, 1994).

## I.2 - Bactéries, Actinomycètes, champignons et algues

### I.2.1 – Bactéries

Les bactéries sont les organismes les plus nombreux du sol (Tableau I.1-a). Elles sont unicellulaires, parfois mobiles et leur taille peut varier de 0,2 à 10  $\mu\text{m}$ . Des échanges de matériel génétique se produisent par conjugaison (transfert de matériel génétique d'un donneur vers un receveur avec contact direct), par transduction (transfert direct d'ADN par un virus attaquant la bactérie), ou par transformation (transfert d'un fragment de matériel chromosomique d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice, sans contact direct).

Il existe plus de 200 genres bactériens différents. Parmi les plus représentés dans le sol, on peut citer (Alexander, 1977) :

- les *Arthrobacter*, Gram variables à croissance lente, qui peuvent représenter 5 à 60% des colonies,
- les *Pseudomonas*, Gram- mobiles, représentant 3 à 20% des UFC (unités formant colonie). Ils utilisent une grande variété de substrats organiques : sucres, acides aminés, acides humiques, huiles et de nombreux pesticides,
- le genre *Bacillus*, bâtonnets sporulants Gram+ ou Gram variables, souvent mobiles, qui est également bien représenté dans les sols : de 7 à 67%,
- les *Clostridium*, bactéries anaérobies utilisées pour la production d'alcool et de solvants.

### I.2.2 – Actinomycètes

Ce sont des bactéries hétérotrophes qui forment une structure végétative de type mycélien, plus fine que celle des champignons (1,0 à 1,5  $\mu\text{m}$ ).

Dans le sol, les genres les plus fréquents sont les *Streptomyces* qui représentent jusqu'à 90% des genres identifiés, et les *Nocardia*. Ils sont particulièrement aptes à dégrader des substances organiques difficilement décomposables et produisent des vitamines et des antibiotiques (Bonneau et Souchier, 1994).

### I.2.3 – Champignons

Bien que moins nombreux que les bactéries dans les dénombrements sur boîte de Pétri, les organismes hétérotrophes eucaryotes que sont les champignons sont les principaux responsables de la décomposition des résidus organiques dans les sols. Ils sont divisés en sous-groupes selon leurs caractères morphologiques.

Les Basidiomycètes appartiennent à la classe des champignons dits supérieurs. Ce sont des décomposeurs très actifs de résidus ligneux comme la cellulose et/ou la lignine. Le nombre d'espèces fongiques dégradant la lignine a été estimé à 2.000 (Gilbertson, 1980) ;

elles sont classées en fonction du type de pourriture du bois, qui correspond à différents types d'attaques enzymatiques : pourriture brune et pourriture blanche.

#### I.2.4 – Algues

Les algues microscopiques sont des organismes unicellulaires, groupés en colonies ou filamenteux. Leurs principales activités dans les sols sont la fixation du CO<sub>2</sub>, la fixation biologique de l'azote, et la consolidation des surfaces. Leur capacité à solubiliser des minéraux, à produire des substances de croissance pour les plantes et à absorber ou dégrader les polluants des sols a été soulignée dans la littérature (Warshawsky et al., 1988).

#### I.2.5 - Répartition dans les sols

Dans les sols, les micro-organismes sont beaucoup plus nombreux dans les litières, les horizons de surface et la rhizosphère des plantes où les conditions énergétiques et nutritionnelles sont les meilleures (Tableau I.2.5-a).

Micro-organismes	Sol rhizosphérique	Sol non rhizosphérique
	Nombre UFC/g de matière sèche	
Grands groupes taxonomiques		
Bactéries	1200.10 <sup>6</sup>	50.10 <sup>6</sup>
Actinomycètes	46.10 <sup>6</sup>	7.10 <sup>6</sup>
Champignons	12.10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Protozoaires	24.10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Algues	5.10 <sup>3</sup>	27.10 <sup>3</sup>
Groupes nutritionnels bactériens		
Ammonifiants	500.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>6</sup>
Anaérobies	12.10 <sup>6</sup>	6.10 <sup>6</sup>
Dénitrifiants	126.10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>

**Tableau I.2.5-a** : Comparaison de la population microbienne d'un sol rhizosphérique et d'un sol non-rhizosphérique (Bonneau et Souchier, 1994).

#### I.3 - Activités microbiennes dans les sols

L'activité des micro-organismes du sol ne se manifeste que si les conditions énergétiques et nutritionnelles sont satisfaites. Les nutriments doivent répondre à 3 besoins : fournir de l'énergie pour la croissance cellulaire, fournir des matériaux pour la synthèse des constituants cellulaires et être utilisables comme accepteurs des électrons libérés au cours de la production d'énergie (Figure I.3-a).

Les écologistes microbiens ont identifié des limites de conditions environnementales critiques qui affectent l'activité des micro-organismes du sol (Tableau I.3-a).

Beaucoup de ces conditions sont contrôlables et peuvent être modifiées pour augmenter la biodégradation des composés organiques, si cela est nécessaire.



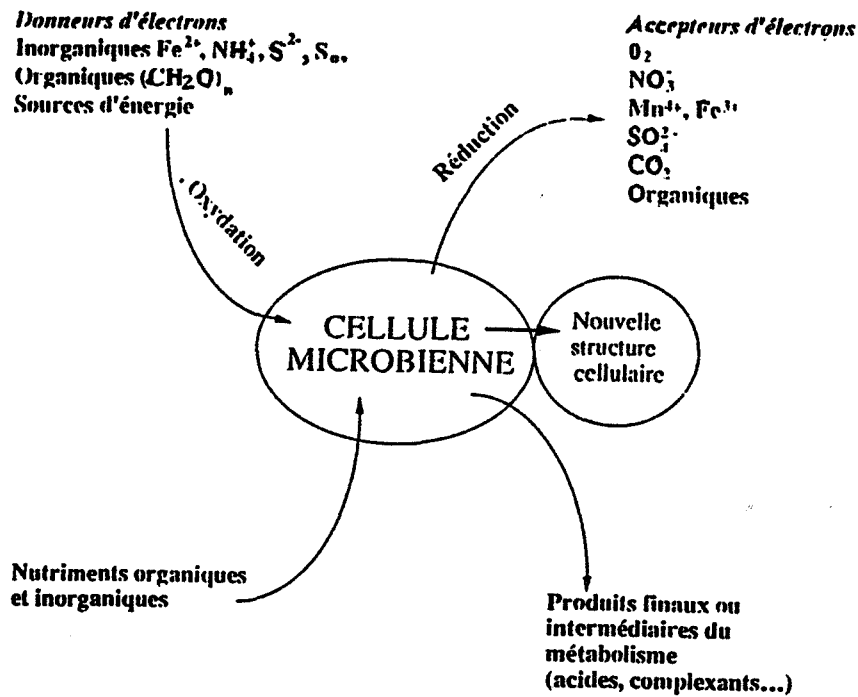


Figure I.3-a : Schéma général de l'activité microbienne.

Facteurs environnementaux	Niveaux optima
Eau du sol disponible	25-85% de la capacité de rétention de l'eau ; potentiel hydrique = 0,01MPa
Oxygène	<u>Métabolisme aérobie</u> : oxygène dissous > 0,2 mg/l ; pores remplis à 10% d'air minimum <u>Métabolisme anaérobie</u> : oxygène < 1% en volume
Potentiel redox	Aérobies et aérobies facultatifs : > 50 mV Anaérobies : < 50 mV ; pH = 5,5-8,5
Nutriments	Suffisamment d'azote, de phosphore et d'autres nutriments pour ne pas inhiber la croissance microbienne (le ratio conseillé de C:N:P est de 120:10:1).
Température	15-45°C (mésophiles)

Tableau I.3-a : Optima des conditions environnementales pour la croissance microbienne (Sims et al., 1990).

### I.3.1 - Facteurs physico-chimiques

#### I.3.1.1 - L'eau

L'eau est nécessaire à la vie microbienne et le potentiel hydrique ( $\psi$ , qui correspond à l'énergie avec laquelle l'eau est retenue dans le sol) contre lequel les micro-organismes doivent extraire l'eau du sol régule leur activité.

$$\psi = RT \cdot \ln(a_w/V)$$

où :

R : constante des gaz parfaits

T : température (K)

V : volume molaire partiel

$a_w$  : activité de l'eau

$\psi$  : potentiel hydrique (en -MPa ou -bar)

Les micro-organismes qui ont besoin de l'eau pour leur métabolisme sont capables de la désorber même à des potentiels très élevés. Le potentiel hydrique de l'eau pure est nul.

L'activité de l'eau dépend du nombre de moles d'eau, du nombre de moles de soluté et des coefficients d'activité pour l'eau et le soluté. Par définition, l'activité de l'eau distillée libre est 1,0. La plupart des micro-organismes exige une activité de l'eau voisine de 0,96 pour avoir un métabolisme actif, mais des champignons et des lichens peuvent croître à des activités de 0,6 (Tableau I.3.1.1-a).

Activité de l'eau ( $a_w$ )	Bactéries	Champignons
1,00	<i>Caulobacter</i> <i>Spirillum</i>	
0,90	<i>Lactobacillus</i> <i>Bacillus</i>	<i>Fusarium</i> <i>Mucor</i>
0,85	<i>Staphylococcus</i>	<i>Debaromyces</i>
0,80		<i>Penicillium</i>
0,75	<i>Halobacterium</i>	<i>Aspergillus</i>
0,60		<i>Saccharomyces rouxii</i> <i>Xeromyces bisporus</i>

**Tableau I.3.1.1-a** : Activités de l'eau requises pour la croissance de divers micro-organismes (Atlas and Bartha, 1993).

L'eau du sol sert aussi de milieu de transport à travers lequel de nombreux nutriments et composés organiques diffusent jusqu'à la cellule microbienne, et grâce auquel les déchets métaboliques sont éliminés. Les mouvements de l'eau, liés au potentiel hydrique, sont à l'origine du transfert des substrats, nutriments et gaz, dissous dans les agrégats du sol. Ils interviennent surtout lorsque le potentiel hydrique est élevé. L'eau affecte aussi l'état d'aération du sol, la nature et la quantité de produits solubilisés, la pression osmotique sol-eau, ainsi que le pH du sol (Paul and Clark, 1989).

Un excès d'humidité peut affecter négativement l'activité microbienne en empêchant le mouvement de l'air et donc en diminuant la quantité d'oxygène disponible, source principale d'accepteurs d'électrons pour la majorité des micro-organismes du sol (Alexander, 1977).

Si l'oxygène est consommé plus rapidement qu'il n'est remplacé par diffusion, un sol aérobie peut devenir anaérobie : la teneur en eau des sols peut donc modifier les activités microbiennes. La modification quantitative et qualitative des populations microbiennes au cours de la diminution de la teneur en eau du sol est directement liée à la capacité de ces populations à extraire l'eau retenue dans les pores très fins ou à la quantité d'air disponible. Les populations fongiques, aérobies strictes, vont croître avec la baisse de la teneur en eau à laquelle certaines pourront résister jusqu'à des valeurs correspondant à des potentiels hydriques de -500 bar.

La disponibilité de l'eau dans les sols est traditionnellement mesurée en relation avec la WHC (pour Water Holding Capacity) du sol. La quantité d'eau qui reste dans un sol après saturation du sol en eau et écoulement libre de l'eau est définie comme une WHC de 100. Les

conditions optimales pour l'activité des micro-organismes aérobies du sol sont situées entre 50% et 70% de la WHC, ce qui correspond à une activité de l'eau entre 0,98 et 0,99. Si le sol contient plus d'eau que cela, il y a des interférences avec la disponibilité de l'oxygène (Atlas and Bartha, 1993).

#### I.3.1.2 - L'oxygène

Si l'accepteur d'électrons du métabolisme microbien est l'oxygène, la respiration est aérobie ; s'il est minéral, autre que l'oxygène ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{Mn}^{4+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_2$ ), la respiration est anaérobie. Si l'accepteur est un composé organique (comme l'acide pyruvique), il s'agit d'une fermentation (Figure I.3-a).

Une large fraction de la population microbienne du sol utilise l'oxygène comme accepteur terminal d'électrons dans son métabolisme. Dans les strates élevées du sol, les chemins de dégradation sont donc essentiellement aérobies (Sims et al., 1990).

Les niveaux d'oxygène dans le sol peuvent être maintenus :

- par la prévention de la saturation en eau
- par la présence de sable
- en évitant le compactage du sol
- en limitant l'addition de produits carbonés.

#### I.3.1.3 - Le potentiel d'oxydo-réduction

De nombreuses réactions enzymatiques sont des réactions d'oxydo-réduction dans lesquelles un composé est oxydé et un autre réduit. La capacité d'un organisme à réaliser des réactions d'oxydo-réduction dépend de l'état oxydo-réducteur de l'environnement. Un potentiel redox ( $E_h$ ) positif indique un environnement qui favorise les oxydations, alors qu'un  $E_h < 0$  indique un environnement réducteur (Paul and Clark, 1989).

Les micro-organismes aérobies stricts ne peuvent être métaboliquement actifs qu'à  $E_h > 0$ , alors que les anaérobies stricts ne le sont qu'à  $E_h < 0$  (Sims et al., 1990). Les anaérobies facultatifs peuvent agir sur une large gamme de potentiels en utilisant l'oxygène comme accepteur d'électrons à  $E_h > 0$ , et par fermentation ou en utilisant des accepteurs d'électrons comme le fer ferrique ou les ions nitrates à  $E_h$  faibles (Atlas and Bartha, 1993).

La solubilité de certains nutriments est fortement affectée par les valeurs de  $E_h$ . Ainsi, quand  $E_h$  est grand, le fer et le manganèse existent respectivement sous les formes  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Mn}^{4+}$ , qui sont insolubles et souvent non disponibles pour la croissance microbienne. Par contre, quand  $E_h$  est faible, ces métaux existent sous les formes bivalentes  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ , qui sont solubles et disponibles pour la croissance microbienne.

Le potentiel redox est fortement influencé par la présence ou l'absence d'oxygène moléculaire : les environnements en équilibre avec l'oxygène atmosphérique ont des potentiels redox autour de +800 mV. Le potentiel redox des eaux aérobies naturelles est entre 400 et 500 mV, à cause de l'activité microbienne. De faibles potentiels redox peuvent être dus à une importante croissance de micro-organismes hétérotrophes qui mobilisent tout l'oxygène disponible (Atlas and Bartha, 1993).

#### I.3.1.4 - Le pH

Les micro-organismes ne peuvent en général pas tolérer des valeurs de pH extrêmes. Sous des conditions fortement acides ou alcalines, certains composants de la cellule microbienne peuvent être hydrolysés ou des enzymes dénaturées. L'acidité et l'alcalinité des

milieux permettent de distinguer des organismes acidiphiles, acidotolérants, neutrophiles, alcalinotolérants, basiphiles ou alcalinophiles (Tableau I.3.1.4-a).

Organismes	pH		
	Minimum	Optimum	Maximum
<i>Escherichia coli</i>	4,4	6,0-7,0	9,0
<i>Proteus vulgaris</i>	4,4	6,0-7,0	8,4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4,4	6,0-7,0	9,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5,6	6,6-7,0	8,0
<i>Erwinia carotovora</i>	5,6	7,1	9,3
<i>Clostridium sporogenes</i>	5,5-5,8	6,0-7,6	8,5-9,0
<i>Nitrosomas spp.</i>	7,0-7,6	8,0-8,8	9,4
<i>Nitrobacter spp.</i>	6,6	7,6-8,6	10,0
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1,0	2,0-2,8	6,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4,0	4,6-5,8	6,8
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	2,0	3,5	6,0
<i>Thermoplasma acidophilus</i>	1,0	1,5	4,0
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1,0	2,5	4,0
<i>Bacillus alcalophilus</i>	8,5	9,5	11,5

Tableau I.3.1.4-a : pH minimum, optimum et maximum de différentes bactéries (Atlas and Bartha, 1993).

La plupart des micro-organismes croissent à des pH compris entre 5,0 et 9,0 avec des pH optima voisins de la neutralité, mais quelques espèces croissent à des pH inférieurs à 2,0 ou à des pH supérieurs à 10,0. Les bactéries d'un même genre peuvent avoir des activités dans des domaines très différents de pH. Les champignons sont souvent plus tolérants aux conditions acides (pH<5) que les bactéries (pH de 6 à 8).

Le pH affecte les micro-organismes et les enzymes microbiennes, mais aussi la dissociation et la solubilité de nombreuses molécules qui agissent directement sur les micro-organismes. Le pH détermine en partie la solubilité du CO<sub>2</sub>, la disponibilité de nutriments comme l'ammonium et les phosphates, la mobilité des métaux lourds, comme le cuivre, qui sont toxiques pour les micro-organismes (Atlas and Bartha, 1993). La solubilité du phosphore est ainsi maximisée à pH=6,5 (Sims et al., 1990).

### I.3.1.5 - La température

Tous les micro-organismes ont une température optimale de croissance caractéristique à laquelle ils ont leur plus fort taux de reproduction et de croissance. Ils ont aussi des températures minimales de croissance en-dessous desquelles ils sont métaboliquement inactifs et ne croissent pas, ainsi que des limites supérieures de température au-delà desquelles ils ne réussissent pas à croître. La température optimale de croissance et la gamme des températures qu'un micro-organisme peut tolérer déterminent la survie d'un micro-organisme et le rôle qu'il va jouer dans un écosystème donné (Atlas and Bartha, 1993).

Quelques micro-organismes peuvent croître en-dessous de 0°C, d'autres au-dessus de 100°C. On distingue des micro-organismes psychrophiles, mésophiles et thermophiles, qui croissent respectivement à des températures basses (<15°C), moyennes (de 15 à 45°C) et plus élevées (>45°C) (Bonneau et Souchier, 1994). Des thermophiles extrêmes (90°C-110°C) ont été mis en évidence avec une température optimale de 105°C et pas de croissance en-dessous de 85°C (Fisher et al., 1983).

En plus d'affecter la survie et la croissance, la température affecte les activités métaboliques des micro-organismes. En général, une augmentation de température qui ne tue pas les micro-organismes résulte en une augmentation des activités métaboliques. Le changement d'activité enzymatique causé par une augmentation de 10°C est connu comme le  $Q_{10}$ .

$$Q_{10} = (\text{activité à la température } T + 10^\circ\text{C}) / (\text{activité à la température } T)$$

En général, les enzymes ont un  $Q_{10}$  voisin de 2, c'est-à-dire qu'une augmentation de 10°C dans la zone tolérée par l'enzyme résulte en une activité doublée. Le Tableau I.3.1.5-a donne des valeurs de  $Q_{10}$  pour certaines enzymes.

Enzyme	$Q_{10}$
Catalase	2,2 (10°C-20°C)
Maltase	1,9 (10°C-20°C)
Maltase	1,4 (20°C-30°C)
Oxydase succinique	2,0 (30°C-40°C)
Uréase	1,8 (20°C-30°C)

Tableau I.3.1.5-a : Valeurs de  $Q_{10}$  pour quelques enzymes (Atlas and Bartha, 1993)

#### I.3.1.6 - La salinité

La salinité exerce un effet osmotique sur les micro-organismes, qui ont aussi des besoins en sels comme NaCl, KCl et MgCl<sub>2</sub>. Les fortes concentrations ont tendance à dénaturer les protéines, c'est-à-dire à casser la structure tertiaire des protéines qui est essentielle à l'activité enzymatique (Atlas and Bartha, 1993). La plupart des micro-organismes ont des besoins limités en sels et sont inhibés par des teneurs en NaCl supérieures à 2%, sauf les espèces halophiles (bactéries, champignons, algues) qui croissent en milieux salins et supportent bien des teneurs en NaCl de 15%, comme *Brevibacterium halotolerans* (Bonneau et Souchier, 1994).

#### I.3.1.7 - Les nutriments

De nombreux composés inorganiques sont des nutriments essentiels pour les micro-organismes et d'autres leur sont toxiques (Stotzky and Norman, 1964).

Les composés inorganiques importants en écologie microbienne sont (Atlas and Bartha, 1993):

- des gaz : oxygène, dioxyde de carbone, monoxyde de carbone, hydrogène, azote, sulfure d'hydrogène, oxyde nitreux,
- la forme élémentaire du soufre,
- les cations : ammonium, fer ferreux, fer ferrique, magnésium, calcium, silice, sodium, potassium, bore, cobalt, cuivre, manganèse, molybdène, vanadium, nickel, zinc, mercure, cadmium et plomb,
- les anions : phosphate, carbonate, bicarbonate, sulfure, sulfate, nitrite, nitrate, chlorure, chlorate, bromure, fluorure, silicate et arsénate.

Les métaux lourds ont une place à part dans les nutriments. Certains sont nécessaires à l'état de trace, mais ils peuvent être toxiques à de relativement faibles concentrations (Gadd, 1990). Ils sont solubles à bas pH, alors qu'ils précipitent aux pH élevés, ce qui réduit leur toxicité. Ils se fixent également sur la matière organique, et leur effet est le même.

L'azote sous forme gaz est une forme inerte d'azote pour la plupart des micro-organismes. Les nutriments les plus importants contenant de l'azote sont les ions

ammonium, nitrate et nitrure. L'azote est nécessaire à la formation des protéines (Atlas and Bartha, 1993).

Le phosphore est nécessaire à la production d'ATP et à la synthèse de la membrane phospholipidique. Toutefois, de fortes concentrations peuvent inhiber la croissance microbienne. Les concentrations en azote et phosphore disponibles limitent souvent la productivité et la décomposition dans les habitats aquatiques (Atlas and Bartha, 1993).

Des ajouts d'azote et de phosphore disponibles sont souvent réalisés pour augmenter la productivité en aquaculture. L'élimination de la limitation en phosphate est parfois indésirable, car elle peut mener à la prolifération d'algues ou de cyanobactéries.

Toutefois, l'addition contrôlée d'azote et de phosphore peut améliorer la décomposition de polluants organiques (Sims et al., 1990). Par exemple, la biodégradation du pétrole dans l'eau de mer est limitée à la fois par la teneur en azote et en phosphore ; cette barrière peut être éliminée par l'addition de fertilisants oléophiles azotés et phosphorés (Atlas and Bartha, 1972 ; Atlas, 1977).

Le soufre inorganique sert à la formation des protéines ; le fer est utilisé dans les cytochromes ; le chlore sert essentiellement au maintien du fonctionnement de la membrane.

### **I.3.2 - Influence de la texture et de la structure du sol**

#### **I.3.2.1 - Interactions avec les argiles**

La présence d'argiles, leur nature et leur teneur peuvent modifier l'activité, le développement de populations et la survie de micro-organismes, mais leur rôle reste à préciser (Bonneau et Souchier, 1994). Divers effets des minéraux argileux ont été observés (Dommergues et Mangenot, 1970).

La présence de montmorillonite favorise les transferts génétiques par conjugaison (Weinberg and Stotzky, 1972). La présence d'argile limiterait la respiration et la croissance des champignons, mais favoriserait celles des bactéries (Stotzky and Rem, 1966, 1967). La biodégradation des produits organiques pourrait être accélérée ou ralentie par la présence d'argiles qui assurent aussi une protection contre les métaux lourds (Babich and Stotzky, 1977, 1979).

Ces effets ne sont encore pas bien expliqués, sauf quand les argiles, par leur capacité d'échange, exercent un effet protecteur (adsorption de métaux toxiques et d'antibiotiques, effet tampon sur le milieu) ou modifient la viscosité et les échanges gazeux. Les argiles protègent aussi contre la dessiccation et assurent la survie ou le maintien de populations microbiennes pendant de longues périodes de sécheresse (Bonneau et Souchier, 1994).

#### **I.3.2.2 - Interactions avec les agrégats**

Les bactéries et champignons du sol jouent un rôle important dans la formation et la stabilité des agrégats du sol. Cette agrégation se produit par l'effet d'adhésion des produits du métabolisme bactérien ou racinaire (essentiellement polysaccharidiques) et par l'enchevêtrement des particules de sol par les champignons filamenteux (Griffiths, 1965 ; Tisdall and Oades, 1982 ; Moloche et al., 1987). Les bactéries interviendraient dans la formation de petits agrégats à l'échelle du micron, où elles sont liées aux particules d'argiles (Figure I.3.2.2-a), chargées également négativement, par des ponts ioniques *via* des cations multivalents.

On a d'abord considéré que la biomasse microbienne était plus particulièrement localisée dans la fraction 2-50  $\mu\text{m}$  du sol, avec les matières organiques les plus stables (Ladd

On a d'abord considéré que la biomasse microbienne était plus particulièrement localisée dans la fraction 2-50  $\mu\text{m}$  du sol, avec les matières organiques les plus stables (Ladd et al., 1977a, 1977b). Puis Hattori (1988) a suggéré qu'il existait 2 types de répartition sur et dans les agrégats : une biomasse relativement plus active, mais aussi plus sensible à l'action des prédateurs se situerait à la surface des microagrégats (Vargas and Hattori, 1986 ; Couteaux et al., 1988) et une biomasse plus passive serait localisée dans les microagrégats dont l'abondance dépendrait de la teneur en argile du sol. Des chercheurs n'ont en revanche décelé, sur des observations au microscope électronique, des microfiores que dans des agrégats (Kilbertus, 1980).

Il a été démontré récemment que la localisation de la biomasse dépend du type de sol, de sa texture et de l'horizon étudié (Jocteur-Monrozier et al., 1991).

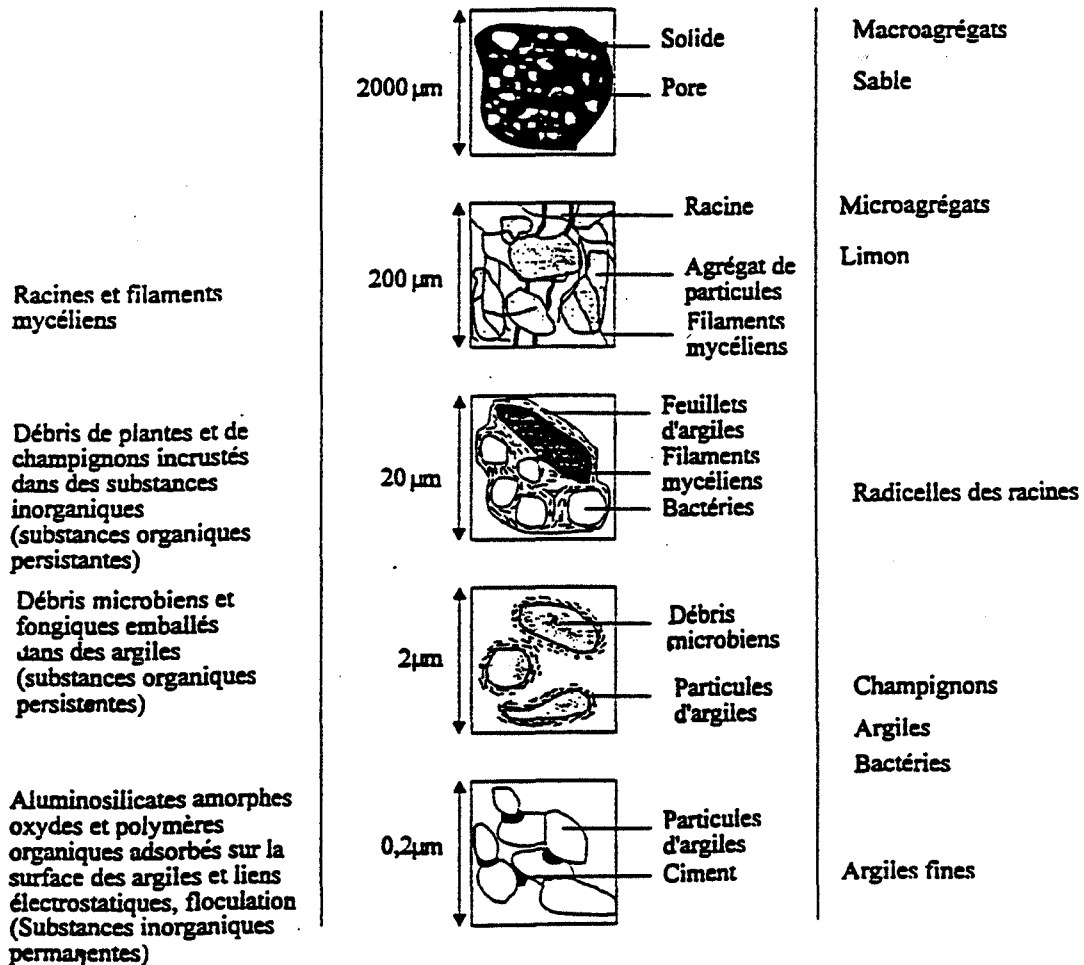


Figure I.3.2.2-a : Interactions entre micro-organismes et agrégats dans les sols (Tisdall and Oades, 1982).

L'agrégation joue aussi un rôle protecteur sur la minéralisation de l'azote et du carbone. Sa destruction mécanique accroît l'activité respiratoire du sol. L'activité microbienne dans les agrégats, structure spatiale élémentaire, est réglée par la taille de l'agrégat et de ses ponts, qui contrôle la colonisation par les micro-organismes, la diffusion des nutriments et l'humidité (Bonneau et Souchier, 1994).

### I.3.3 - Interactions entre micro-organismes

La croissance des micro-organismes a été le plus souvent étudiée et modélisée dans des conditions de culture pure (Slater et al., 1979), alors que dans les sols ils se développent

en présence d'autres organismes (micro-organismes, animaux, racines) et dans un système poreux, où ils sont le plus souvent fixés sur des constituants minéraux, organiques et organo-minéraux. Divers types d'interactions peuvent exister entre des populations microbiennes.

Le **neutralisme** est une absence d'interaction microbienne.

Quand l'association de micro-organismes entraîne un bénéfice réciproque sans que cette association soit obligatoire pour leur existence et leur activité, il s'agit de **synergisme**. Lorsqu'elle est obligatoire, c'est du **mutualisme** (ou symbiose). Quand une seule espèce est bénéficiaire de l'association, l'autre n'en étant pas affectée, il s'agit de **commensalisme**.

La **compétition** conduit à l'élimination d'un des organismes en lutte pour une quantité limitée de nutriments ou d'autre ressource physique. On parle d'**amensalisme**, quand une espèce est supprimée, alors que la seconde n'est pas affectée, comme lors de la production de substances toxiques. Le **parasitisme** et la **prédation** correspondent à une attaque directe d'un organisme par l'autre (Alexander, 1977).

Les associations bénéfiques non symbiotiques se rencontrent fréquemment dans les sols, comme celles qui associent des champignons cellulolytiques producteurs d'acides à des bactéries consommatrices de ces acides (Bonneau et Souchier, 1994).

A côté des relations bénéfiques ou neutres peuvent s'établir des relations de prédation illustrées par les relations prédateurs-proies existant entre des protozoaires et des bactéries (Danso et al., 1975 ; Couteaux et al., 1988).

#### **I.4 - Les processus généraux de biodégradation**

Les micro-organismes, et particulièrement les bactéries, sont présents dans tous les sols, parfois à des taux élevés. Ils représentent la voie majeure de dégradation des composés organiques issus des végétaux.

L'introduction relativement soudaine de xénobiotiques (pour la plupart des molécules organiques) ou le stockage massif de composés naturels peut dépasser la capacité de nettoyage de l'écosystème perturbé. Cela résulte en l'accumulation des polluants à des niveaux préoccupants, voire dangereux.

La biorémédiation des sols exploite la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux, qui sont ensuite intégrés dans les cycles géochimiques naturels. Elle exploite le potentiel métabolique des micro-organismes existants par l'utilisation de nouvelles fonctions cataboliques issues soit de la sélection, soit de l'introduction de gènes codant pour ces fonctions (Van der Meer et al., 1992 ; Gottschalk and Knackmuss, 1993). Les processus de biodégradation se développent en général spontanément dans le sol, mais certains nécessitent une phase plus ou moins longue d'adaptation à la dégradation de ces différents produits.

##### **I.4.1 - L'adaptation à la dégradation des xénobiotiques**

La capacité des populations microbiennes de s'adapter à des produits chimiques anthropogéniques est évidente lorsqu'on évoque l'enrichissement sélectif d'organismes résistant aux antibiotiques qui a suivi l'utilisation intensive des antibiotiques.

Un nombre croissant de données suggère que des processus d'adaptation similaires se produisent avec de nombreux autres contaminants. Les réponses de l'adaptation incluent la



sélection naturelle de mutants possédant les enzymes de dégradation avec des spécificités de substrat larges, ou même avec de nouvelles activités métaboliques.

Le phénomène d'adaptation peut être défini comme les changements intervenant à la suite d'une perturbation, et visant à rétablir un nouvel équilibre dans la communauté microbienne.

#### I.4.1.1 - Les mécanismes de l'adaptation

Trois types d'adaptation sont généralement proposés pour la biodégradation des pesticides et autres polluants (Spain, 1990) :

- des micro-organismes dégradant le produit sont présents dans le sol, mais leur taux de population est faible. Cette population va alors progressivement augmenter à un niveau suffisant pour provoquer une disparition significative du produit (Aelion et al., 1987).

- ces micro-organismes sont présents, mais les enzymes nécessaires à la dégradation doivent être synthétisées. La phase de latence sera alors plus longue que précédemment.

- une adaptation génétique s'ajoute aux phénomènes précédents. Elle se traduit sous la forme d'un transfert de gènes codant pour les enzymes de dégradation, ou par l'acquisition de nouvelles capacités par l'intermédiaire de mutations. La phase de latence est alors souvent très longue (Figure I.4.1.1-a).

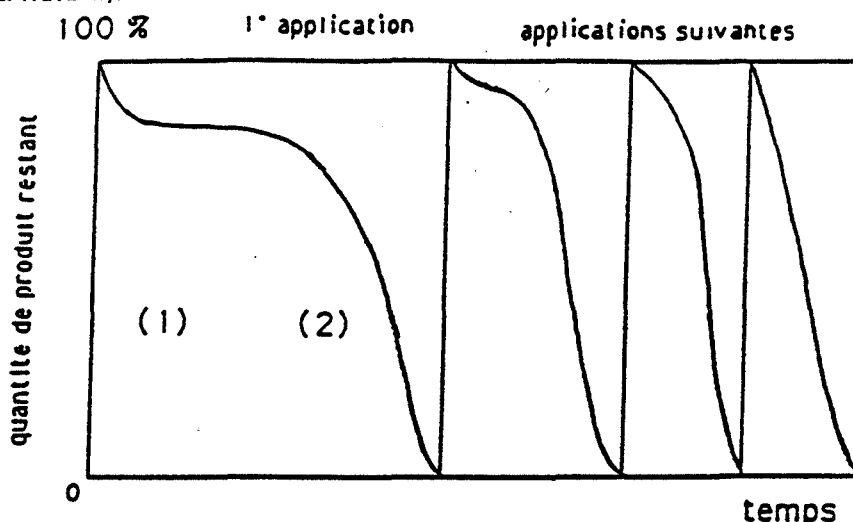


Figure I.4.1.1-a : Mise en évidence des phénomènes d'adaptation dans les sols (Martins, 1993). (1) = phase de latence ; (2) = phase de biodégradation.

Dans le cas de l'adaptation génétique des micro-organismes, l'évolution correspond à un processus de mutations spontanées des voies métaboliques préexistantes, ou bien à l'expression de nouvelles capacités cataboliques codées sur des fragments d'ADN, généralement des plasmides, acquis par les micro-organismes (Van der Meer et al., 1992).

L'adaptation des micro-organismes dépend de nombreux facteurs environnementaux, comme la concentration en polluant, le temps d'exposition, la concentration en micro-organismes (Pritchard et al., 1987 ; Greer et al., 1990 ; Comeau et al., 1993), le pH (cf.I.3). Il existe différentes raisons à cette barrière d'évolution.

La concentration des polluants peut être trop faible pour soutenir la croissance de micro-organismes capables de les métaboliser. Bien que de faibles concentrations de polluant puissent être nocives à des êtres humains ou d'autres organismes, elles peuvent ne pas appliquer une pression de sélection suffisante pour enrichir le sol en micro-organismes capables de métaboliser ce polluant, en particulier en présence de substrats plus labiles (Rittman and MacCarthy, 1980). Inversement, si la concentration est trop forte, la toxicité du

polluant peut provoquer la mort de la totalité de la population microbienne, et cela avant que les mutants capables de métaboliser les faibles concentrations de polluant puissent répondre aux pressions de sélection et proliférer.

L'adaptation obtenue avec des concentrations élevées est en général moins stable au cours du temps : des pertes d'activité ont alors été observées suite à la disparition de la pression de sélection (Fournier, 1989). Elle est d'autant plus rapide que les molécules polluantes sont structurellement proches de molécules naturellement présentes dans les sols. C'est le cas pour les molécules aromatiques : les molécules polyphénoliques, dérivées des végétaux (lignine, tanin, ...), abondent dans les sols.

#### I.4.1.2 - Les supports de l'adaptation

Le support physique de l'adaptation est une molécule d'ADN (Danganan et al., 1994), et les capacités de dégradation sont portées soit par le chromosome bactérien, soit par des éléments extra-chromosomiques (plasmides, transposons ou phages) (Van der Meer et al., 1992 ; Gottschalk and Knackmuss, 1993).

Les virus bactériens (bactériophages) sont constitués de protéines entourant une molécule d'ADN. Cette molécule est capable de s'intégrer à d'autres fragments d'ADN pour y exprimer des gènes spécifiques. Le prophage obtenu, qui n'est plus virulent, peut alors exprimer des gènes codant pour une voie catabolique nouvelle dans la cellule hôte.

Les transposons sont des fragments d'ADN de petite taille, dont la particularité est de posséder à leurs extrémités des séquences de nucléotides permettant leur insertion dans des molécules d'ADN. Le transfert par conjugaison (transfert de matériel génétique d'un donneur vers un receveur avec contact direct) d'un transposon catabolique a été démontré comme stimulateur de l'adaptation microbienne à la dégradation de différents contaminants organiques chlorés (Van der Meer et al., 1992).

Enfin, le plasmide catabolique (Figure I.4.1.2-a) est sans doute l'élément extra-chromosomique le plus important impliqué dans les phénomènes d'adaptation à la dégradation des polluants (Galli et al., 1985 ; Monticello et al., 1985 ; Jahnke et al., 1990 ; Marquès and Ramas, 1993). Les plasmides cataboliques sont des éléments d'ADN (linéaires ou plus souvent circulaires) de poids moléculaire entre 40 et 200 MDa.

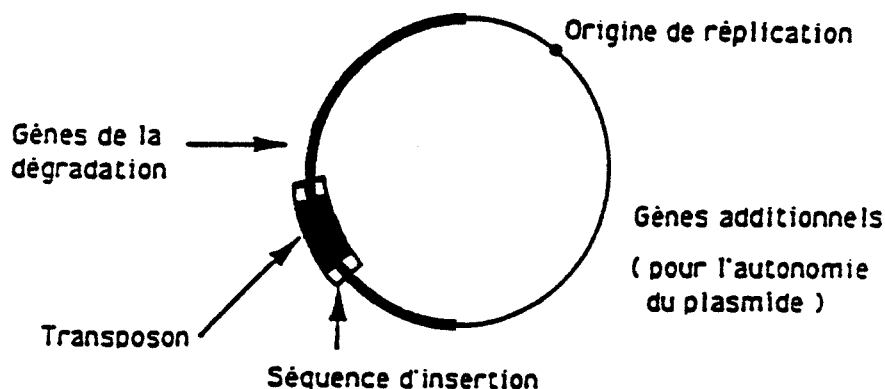


Figure I.4.1.2-a : Structure générale des plasmides cataboliques.

Ils sont autonomes dans les cellules, peuvent s'y trouver en plusieurs copies et sont souvent transmissibles. Ils portent en général une information spécifique : résistance à des

antibiotiques, pathogénicité, ... . Ils ont une structure générale assez conservée, et il n'est pas rare d'y trouver un transposon inséré labile, qui emporte avec lui une partie de l'ADN plasmidique et donc de l'information codée vers un autre plasmide ou le chromosome. Ceci explique le caractère parfois instable des fonctions portées par les plasmides et donc exprimées par les cellules contenant ces plasmides (Shields et al., 1985). La distribution horizontale de plasmides cataboliques au sein des communautés microbiennes est supposée être un important support de l'adaptation (Van der Meer et al., 1992).

Les mutations spontanées et la sélection environnementale représentent sans doute le mécanisme principal de l'évolution bactérienne de la capacité de dégrader des xénobiotiques (Van der Meer et al., 1992).

#### **I.4.2 - Les principaux processus de transformation**

Cinq processus impliqués dans les biotransformations de xénobiotiques ont été définis dans la littérature. Ce sont la minéralisation, le cométabolisme, la polymérisation, l'accumulation et les effets secondaires de l'activité microbienne (Bollag and Liu, 1990).

La biotransformation d'une molécule de polluant peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément ou successivement et conduire à la formation de différents produits issus du métabolisme d'un ou plusieurs micro-organismes.

L'amplitude de la transformation dépend de différents facteurs biotiques et abiotiques, comme la température, l'humidité, le pH, la pression partielle d'oxygène dans le sol, la concentration en polluant (cf. I.3).

##### I.4.2.1 - La minéralisation

C'est la conversion d'une molécule organique en ses constituants inorganiques ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). C'est donc le processus le plus intéressant car il conduit à une épuration totale du milieu pollué. Le xénobiotique est utilisé comme source de carbone et d'énergie.

La minéralisation a lieu lorsqu'un composé organique est attaqué par les mécanismes cellulaires cataboliques et anaboliques centraux (Madsen, 1991).

Les organismes responsables tirent en général profit des réactions de minéralisation : une croissance microbienne est attendue et une partie du carbone initialement dans la molécule organique est en général incorporée dans la biomasse (Alexander, 1981).

##### I.4.2.2 - Le cométabolisme

Le cométabolisme est la modification fortuite d'une molécule par une enzyme qui agit sur une autre molécule (substrat primaire).

Le substrat primaire est le support de la croissance de micro-organismes qui produisent une ou plusieurs enzymes de faible spécificité agissant aussi sur le substrat cométabolisé. Ce dernier est en général seulement faiblement altéré et n'entre pas dans les chemins cataboliques et anaboliques de la cellule microbienne (Madsen, 1991). Par conséquent, l'organisme responsable ne profite pas des réactions de cométabolisme. La croissance microbienne n'est pas un corollaire et on n'attend pas d'accélération des réactions de cométabolisme (Alexander, 1981). Toutefois, d'autres organismes peuvent être capables de minéraliser les produits du cométabolisme.

##### I.4.2.3 - La polymérisation

Les molécules xénobiotiques ne sont pas toujours dégradées directement mais polymérisées, ce qui les rend moins toxiques.

Dans ce processus, les molécules de xénobiotiques s'associent avec elles-mêmes, ou d'autres composés xénobiotiques, ou des composés naturels (Bollag and Loll, 1983). Elles sont alors incorporées à la matière organique du sol et peuvent être relarguées de manière incontrôlée suivant l'activité microbienne du sol.

#### I.4.2.4 - L'accumulation cellulaire

L'adsorption des molécules xénobiotiques est généralement attribuée à des processus passifs car, dans la plupart des cas, les cellules mortes présentent un taux d'adsorption supérieur ou égal à celui des cellules vivantes.

Par exemple, le DDT et le Dieldrin peuvent être adsorbés à environ 100% en quelques minutes, parfois irréversiblement, par des micro-organismes ou des algues unicellulaires (Bollag and Liu, 1990).

Cette adsorption parfois élevée n'est pas nécessairement couplée à une biodégradation. Aussi, l'accumulation cellulaire, par l'intermédiaire du mouvement microbien, peut être un mécanisme important de transport de polluants dans le sol.

#### I.4.2.5 - La biodégradation non-enzymatique

Les micro-organismes peuvent contribuer à la dégradation des polluants de manière indirecte par leur impact sur le milieu.

L'activité microbienne se traduit souvent sous la forme d'une acidification ou d'une alcalinisation (cycle de l'azote) du milieu environnant. Aussi, elle pourra entraîner des modifications de pH qui provoqueront des hydrolyses acides ou alcalines de certains composés (Paul and Clark, 1989).

### **I.4.3 - Les relations entre les communautés microbiennes : optimisation des interactions microbiennes pour la biodégradation**

Nous avons évoqué au I.3.3, qu'en tant que membre d'une communauté écologique, un micro-organisme peut avoir différents types d'interactions avec les autres micro-organismes.

Le développement des interactions positives permet aux micro-organismes d'utiliser les ressources disponibles plus efficacement et d'occuper des habitats qui sinon ne seraient pas occupés. Les interactions négatives, qui limitent les densités de population, représentent des mécanismes d'auto-régulation qui bénéficient aux espèces en empêchant la surpopulation, la destruction de l'habitat et l'extinction.

#### I.4.3.1 - Le neutralisme

Le neutralisme ne peut pas exister entre des populations ayant des fonctions identiques à l'intérieur d'une communauté et il est plus susceptible d'exister entre des populations de capacités cataboliques différentes plutôt qu'entre des populations avec des capacités similaires. Il a lieu quand les populations microbiennes sont spatialement distantes les unes des autres.

Il existe dans les habitats marins et les habitats lacustres oligotrophes où les densités de population sont extrêmement faibles. Dans les sols ou les sédiments, il a lieu lorsque les populations microbiennes occupent des compartiments différents (microhabitats) sur les particules de sol ou de sédiment.

#### I.4.3.2 - Le commensalisme

Dans une relation commensale, une population profite alors que l'autre n'est pas affectée. Ainsi, le cométabolisme, où un organisme agit gratuitement sur un substrat qu'il est

incapable d'utiliser comme nutriment et source d'énergie pendant sa croissance sur un premier substrat particulier, est la base de nombreuses relations commensales. Selon une définition stricte du cométabolisme, le second substrat n'est pas assimilé par l'organisme primaire, mais les produits transformés sont disponibles pour être utilisés par d'autres populations microbiennes.

Or, bien que la transformation spécifique de contaminants sur le terrain soit souvent observée, l'isolement des micro-organismes responsables s'avère souvent difficile. Une partie de la difficulté vient du fait que de nombreux contaminants sont d'abord cométabolisés et le micro-organisme interagit de manière commensale avec d'autres communautés microbiennes qui utilisent les cométabolites comme substrats.

Par exemple, *Mycobacterium vaccae* est capable de métaboliser le cyclohexane quand il pousse sur du propane : le cyclohexane est oxydé en cyclohexanol, que d'autres populations bactériennes utilisent. Ces populations bactériennes profitent car elles sont incapables de métaboliser le cyclohexane (Beam and Perry, 1974).

Le cométabolisme est ainsi le mécanisme prédominant de la transformation de nombreux polluants, dont les PCB (polychlorobiphényles).

Aussi, la compréhension de l'importance du cométabolisme a mené au développement de plusieurs approches de biorémédiation, dont l'enrichissement analogue et l'acclimatation croisée. Dans la première approche, les écosystèmes sont enrichis en micro-organismes cométaboliseurs par addition de composés biodégradables ayant une analogie structurale avec le polluant. Dans la deuxième, les populations microbiennes acclimatées à la dégradation d'un substrat particulier peuvent être simultanément acclimatées à d'autres contaminants liés structuralement.

Ces approches sont validables dans la mesure où elles diminuent le temps entre la première exposition au polluant et la mise en route de la biodégradation.

#### I.4.3.3 - Le synergisme (ou protocoopération)

Les populations microbiennes agissant en synergie se procurent souvent l'une l'autre leurs besoins nutritionnels. Ce type d'interaction peut avoir une base thermodynamique, comme dans le cas des consortia microbiens anaérobies qui transfèrent l'hydrogène. Le synergisme est commun dans les communautés microbiennes anaérobies.

L'excrétion de métabolites peut créer une niche pour les autres organismes et résulter en la succession de communautés. Ainsi, la structure de la communauté microbienne change avec le temps : les différents membres participant au métabolisme séquentiel d'un composé prospèrent quand le métabolite qu'ils utilisent est disponible, puis ils meurent lorsque cette source d'énergie disparaît. Comme les transformations initiales sont souvent dépendantes de l'efficacité des réactions qui éliminent les intermédiaires, l'entité catalytique pour les contaminants métabolisés par synergisme n'est pas un organisme unique, mais un consortium microbien.

Quelques voies importantes de dégradation des pesticides agricoles impliquent des relations synergiques. Des souches d'*Agrobacter* et de *Streptomyces* isolées d'un sol sont ainsi capables de dégrader le diazinon, un pesticide organophosphoré et de croître sur ce composé comme seule source de carbone (Gunner and Zuckerman, 1968). Ceci est accompli par une attaque synergique car aucune des cultures ne peut séparément minéraliser le cycle pyrimidique du diazinon ou croître sur ce composé.

Dans une culture enrichie, *Pseudomonas stutzeri* est capable de cliver le parathion en p-nitrophénol et diéthylthiophosphate, mais n'est capable d'utiliser aucun des deux. *Pseudomonas aeruginosa* peut minéraliser le p-nitrophénol mais est incapable d'attaquer le parathion. La culture à deux composants dégrade en synergie le parathion avec une grande efficacité, *Ps. aeruginosa* semblant utiliser les produits excrétés par *Ps. stutzeri*.

#### I.4.3.4 - Le mutualisme (ou symbiose)

Les relations mutualistes entre les populations peuvent être considérées comme un synergisme étendu : le mutualisme, ou symbiose, est une relation obligatoire entre deux populations qui profite aux deux populations. Une relation mutualiste exige une proximité physique très forte, elle est hautement spécifique, et en général un membre de l'association ne peut pas être remplacé par une espèce de la même famille. Les relations de mutualisme autorisent les organismes à exister dans des habitats qui ne pourraient être occupés par aucune des populations seules, mais cela n'exclut pas que ces populations peuvent exister séparément dans d'autres habitats.

#### I.4.3.5 - La compétition

La compétition est une relation négative entre deux populations, au cours de laquelle chaque population est affectée négativement au niveau de sa survie et de sa croissance. La compétition a lieu lorsque deux populations utilisent la même ressource, soit de l'espace, soit un nutriment limité : les sources de carbone, azote, phosphore, oxygène, les facteurs de croissance, l'eau, etc... peuvent être des ressources pour lesquelles des micro-organismes entrent en compétition.

Ainsi, la dominance d'une espèce par rapport à une autre peut être due à sa croissance plus rapide sous des pressions de sélection imposées, ou à sa plus grande affinité pour un substrat, un nutriment ou une ressource physique (lumière, espace, ...). Veldkamp et al. (1984), au cours d'essais de croissance de deux souches bactériennes en chemostat sous apport limité en nutriments, ont observé le développement de la population à la croissance la plus rapide et l'extinction de la population de plus faible taux de croissance intrinsèque.

Aussi, les micro-organismes dégradateurs font face à la compétition avec d'autres organismes pour les ressources physiques et nutritionnelles et, à cause de la compétition, la bioconversion attendue peut ne pas avoir lieu, même si des micro-organismes dégradateurs sont détectés dans le sol.

#### I.4.3.6 - L'amensalisme (ou antagonisme)

Quand une population microbienne produit une substance inhibitrice pour d'autres populations, la relation interpopulation est appelée amensalisme. La première population peut ne pas être affectée par la substance inhibitrice ou en profiter. L'amensalisme peut mener à la colonisation péremptoire d'un habitat : une fois qu'un organisme s'est établi dans un habitat, il peut empêcher d'autres populations de survivre dans cet habitat. Par exemple, la production d'acide lactique ou d'acides gras de faible poids moléculaire similaires inhibe de nombreuses populations bactériennes (Pohunek, 1961 ; Wolin, 1969).

#### I.4.3.7 - Le parasitisme

Dans une relation de parasitisme, la population qui profite, le parasite, se procure normalement ses besoins nutritionnels chez la population affectée, l'hôte (Hattori, 1973 ; Alexander, 1977). La relation parasite-hôte est caractérisée par une période de contact relativement longue. En général, mais pas toujours, le parasite est de taille inférieure à l'hôte. Certains parasites restent à l'extérieur des cellules de la population hôte, ce sont les exoparasites. D'autres entrent dans les cellules hôtes, ce sont les endoparasites. Normalement,

la relation parasite-hôte est très spécifique. Les habitats disponibles pour les populations parasites obligatoires sont limités par les hôtes disponibles.

Les interactions entre les bactériophages et leurs bactéries hôtes sont sujettes aux modifications environnementales (Roper and Marshall, 1974). Les bactéries hôtes et le phage peuvent être adsorbés sur les particules d'argile dans les sédiments. Dans les sédiments salins, les bactéries fécales, comme *Escherichia coli*, sont protégées des attaques phagiques par adsorption aux particules d'argile. A des salinités plus faibles, *E. coli* et le phage sont désorbés des particules, et le phage parasite peut attaquer et éliminer la population bactérienne hôte. La protection des populations hôtes par sorption sur des particules est un mécanisme important de protection contre le parasitisme.

#### I.4.3.8 - La prédation

Dans le monde microbien, la distinction entre le parasitisme et la prédation n'est pas toujours claire (Hattori, 1973 ; Alexander, 1977). La prédation a lieu typiquement quand un organisme, le prédateur, englobe et digère un autre organisme, la proie. Normalement, les interactions prédateur-proie sont de courte durée et le prédateur est plus gros que la proie (Slobodkin, 1968).

Des considérations théoriques sur les relations prédateur-proie (Lotka, 1925) ont mené à la prédiction que les interactions entre les prédateurs et les proies mènent à des fluctuations cycliques des deux populations. Dans des conditions de pénurie, seuls les plus petits prédateurs survivent : quand la population proie est consommée, il y a sélection en faveur des petits prédateurs.

Les interactions avec les particules d'argile fournissent un mécanisme de protection des bactéries proies par rapport aux populations prédatrices. L'argile crue fournit une séparation physique entre le prédateur et la proie, comme l'ont montré Roper and Marshall (1978) en mesurant la diminution de la prédation d'*Escherichia coli* par *Vexillifera* en présence de montmorillonite. Ceci montre que les structures physiques des habitats naturels fournissent des mécanismes pour atténuer la pression de prédation sur les populations proies, ce qui autorise la coexistence.

En conclusion, les sols pollués peuvent être rémédiés en les inoculant avec des micro-organismes capables de dégrader les contaminants cibles (Morgan and Watkinson, 1989). Les facteurs affectant la survie et l'activité dégradatrice des micro-organismes dans les sols incluent la texture du sol, les paramètres environnementaux (pH, température, potentiel redox, aération), la prédation par les protozoaires, et la compétitivité des souches introduites par rapport aux souches natives (Jackman et al., 1992 ; England et al., 1993).

**Comprendre la structure de la communauté est important pour prédire le devenir des contaminants dans l'environnement et les essais de rémediation à réaliser pour favoriser des groupes spécifiques de micro-organismes.**

## CHAPITRE II : PHYSICO-CHIMIE DE L'INTERACTION SOL-POLLUANT

La compréhension du devenir physico-chimique d'une molécule xénobiotique susceptible d'être véhiculée par l'eau implique de déterminer en quelles quantités cette molécule va se partager entre les différentes phases du sol, mais aussi de quelle manière et à quelle vitesse elle le fera.

Le sol est un système complexe constitué de quatre phases (Figure II-a) : les phases aqueuse, gazeuse, solide organique et solide inorganique.

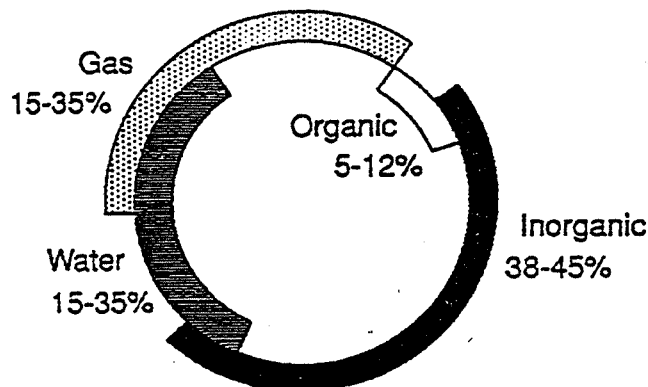


Figure II-a : Les différentes phases du sol, composition volumétrique typique (Sims et al., 1990).

Le gaz et l'eau, que l'on trouve dans les pores du sol, représentent environ 50% (en volume) d'un sol typique. Un constituant organique pourra se trouver dans ces deux phases en proportions variables selon sa solubilité et sa tension de vapeur.

On peut donc définir 6 interfaces entre phases, comme le montre la Figure II-b.

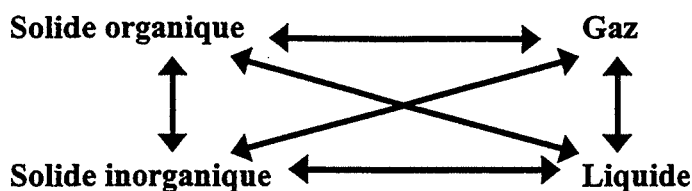


Figure II-b : Les interfaces entre phases du sol.

On peut même ajouter une interface liquide-liquide, dans la mesure où l'eau du sol est divisée en une fraction d'eau mobile (ou libre) et une fraction d'eau immobile (ou liée) de propriétés différentes (Gaudet et al., 1977).

Les interfaces liquide-gaz et solide-gaz doivent être prises en compte dans le cas où le devenir d'une molécule volatile est étudié : elle est en effet susceptible de se retrouver dans l'atmosphère du sol à des concentrations non négligeables.

Pour le cas des molécules peu ou non volatiles (de faible tension de vapeur), ces concentrations peuvent être négligées. Dans ce cas, la prise en compte des seules interfaces solide-liquide suffit pour approcher le comportement de la molécule de choix.



Dans le cas étudié ici, les polluants d'intérêt sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Or ces molécules sont peu ou pas volatiles, à l'exception du naphthalène et de l'acénaphthylène. Ces derniers disparaissent rapidement des sols pollués sous l'effet de la volatilisation ou par des phénomènes de biodégradation. Ils ne sont donc pas d'un grand intérêt pour l'étude menée.

La prise en compte de l'interface liquide-solide est ainsi suffisante pour approcher le comportement des molécules de HAP.

## **II.1 - Influence de la structure de la molécule et des liaisons mises en jeu sur l'adsorption**

L'adsorption d'une molécule organique sur un sol est directement liée à sa structure. Cette structure détermine en effet les propriétés globales de la molécule comme son volume moléculaire, son hydrosolubilité, son coefficient de partage octanol/eau, sa pression de vapeur saturante, qui influencent le comportement adsorbant global du produit (Dragun, 1988).

### **II.1.1 - Le volume moléculaire**

En général, plus une molécule est grosse, plus elle a tendance à exister à l'état adsorbé, et plus la contribution des forces de Van der Waals au potentiel d'adsorption est grande.

Ces forces entraînent la formation de liaisons faibles (2 à 4 kJ/mol) et sont dues essentiellement à des forces de dispersion électronique et d'interaction dipôle-dipôle ou charge-dipôle. Elles sont dues aux mouvements synchrones des électrons de deux molécules adjacentes entraînant la formation d'une attraction électrostatique faible, constante.

Aussi, bien que les dipôles instantanés ou induits soient en mouvement sur la surface de la molécule polluante et sur la surface du sol, le résultat est une attraction entre la molécule et la surface du sol. En règle générale, les forces de Van der Waals représentent le phénomène d'adsorption prédominant dans les sols non sableux lorsque le poids moléculaire du produit chimique est supérieur à 400 ou 500 (Dragun, 1988).

Des recherches ont montré que certains produits chimiques (PCB, HAP notamment) se lient à des macromolécules organiques dissoutes comme les acides humiques, fulviques ou la matière organique (Landrum et al., 1984 ; Chiou et al., 1986). Mais il est important de souligner que, dans la plupart des systèmes sol-eau, ces macromolécules ne sont pas mobiles. Elles sont largement adsorbées sur les sols en grande partie par l'intermédiaire des forces de Van der Waals (Dragun, 1988).

### **II.1.2 - L'hydrophobie**

L'hydrophobie est définie comme la migration préférentielle et l'accumulation d'un produit organique dans des solvants hydrophobes ou sur des surfaces hydrophobes, comme la matière organique du sol, par rapport à des solvants aqueux ou des surfaces hydrophiles.

Il y a formation de liaisons hydrophobes entre le produit et le sol. Ces liaisons correspondent donc à des processus de partition de molécules hydrophobes entre la phase aqueuse et la phase organique du sol.

Certains auteurs assimilent ces interactions à des phénomènes de solvation (Chiou et al., 1979) survenant dans tous les sols où le taux de matière organique est suffisant pour bloquer tous les autres mécanismes, en particulier ceux se déroulant au contact des argiles (Green and Karickhoff, 1990).

### II.1.3 - L'ionisation

L'aptitude des molécules à être ionisées modifie beaucoup les mécanismes intervenant dans les processus de rétention : une molécule ionisée donne facilement des interactions électrostatiques (répulsives ou attractives, selon le cas) en raison des très nombreux sites ionisés présents dans la phase solide des sols.

Les sols possèdent en général plus de surfaces négatives que de surfaces positives ; les cations organiques peuvent donc être retenus par les charges du sol.

Deux classes de molécules interagiront avec le sol selon des mécanismes différents : les molécules ionisables (acides faibles et bases faibles) qui pourront s'adsorber par des mécanismes ioniques (Koskinen and Harper, 1990), et les molécules non ionisables, souvent hydrophobes, qui se partageront entre l'eau et la matière organique du sol (Chiou et al., 1979).

Pour les molécules pouvant être chargées négativement ou positivement selon le pH, le pI (point isoélectrique) permet de décrire l'effet du pH sur leur adsorption sur les surfaces du sol : si le sol est chargé négativement, alors pour  $\text{pH} > \text{pI}$  où la molécule est négative, il y aura répulsion, et pour  $\text{pH} < \text{pI}$  où la molécule est positive, il y aura attraction (Dragun, 1988).

### II.1.4 - Les liaisons hydrogène

Les liaisons hydrogène sont le quatrième facteur affectant l'adsorption des produits chimiques sur les sols. Ces liaisons correspondent à des interactions dipôle-dipôle d'énergie (de 20 à 40kJ/mole) supérieure aux interactions de Van der Waals. L'atome d'hydrogène, électropositif, sert de pont entre deux atomes électronégatifs : il est lié à l'un des atomes par une liaison covalente, et au deuxième par une liaison électrostatique. Trois types distincts de liaison hydrogène peuvent avoir lieu entre les molécules organiques et le sol.

Dans le premier type, la formation de la liaison hydrogène est réalisée par la liaison d'une molécule organique polaire avec un cation adsorbé par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (cation hydraté) :  $\text{Sol}-(\text{M}^{n+})\text{OH}-\text{H}\cdots\text{O}=\text{C}-\text{R}_2$ . Ce type de liaison a été mis en évidence pour de la montmorillonite contenant de la pyridine, de l'acétone, de l'acide benzoïque, du nitrobenzène, des amides et des polymères organiques (Farmer and Mortland, 1966).

Le deuxième type de liaisons hydrogène peut exister entre un cation organique adsorbé et une autre molécule organique :  $\text{Sol}-(\text{R}_3\text{NH}^+)\cdots\text{O}=\text{C}-\text{R}_2$ . Dans l'exemple donné, une amine adsorbée forme une liaison hydrogène avec l'oxygène d'un groupement carboxyle.

La troisième catégorie de liaisons hydrogène a lieu entre les fragments d'une molécule organique et l'oxygène ou/et les groupements hydroxyle à la surface des particules de sol (Davis and Hardin, 1976). Ce type de liaisons hydrogène est bien plus faible que la première catégorie quand elles impliquent des molécules organiques plutôt petites. Toutefois, elles peuvent devenir prédominantes quand de grosses molécules organiques comme des polymères sont concernées : le nombre de liaisons hydrogène entre chaque groupement fonctionnel et la surface du sol augmentant, l'adsorption des grosses molécules augmente proportionnellement (Dragun, 1988).

### II.1.5 - L'arrangement et les interactions dans la molécule

L'arrangement tridimensionnel des radicaux qui constituent un composé organique peut avoir un effet déterminant sur sa capacité d'adsorption. L'effet peut être dû à l'interaction intramoléculaire des radicaux adjacents ou à l'interférence avec un mécanisme d'adsorption particulier causé par la présence d'un radical ou plus.

Ainsi, l'introduction d'un groupement OH dans la structure d'un produit chimique doit normalement augmenter sa solubilité dans l'eau et diminuer sa capacité d'adsorption. Toutefois, l'introduction d'un groupement OH dans le benzaldéhyde pour former de l'hydroxybenzaldéhyde résulte en une augmentation de son adsorption sur le charbon actif (Al-Bahrani and Martin, 1976) : ceci est probablement dû à la formation de liaisons hydrogène intramoléculaires entre les groupements CHO et OH, qui diminue la capacité des groupements OH à former des liaisons hydrogène avec l'eau.

L'arrangement tridimensionnel des radicaux constituant la plupart des molécules organiques peut changer par rotation des liaisons simples. Ils vont tourner et se réaligner dans l'espace de manière à atteindre une configuration optimale, le plus souvent plane. Plus l'aire de la surface plane est grande, plus la tendance à l'adsorption est grande.

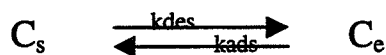
Ainsi, le DDT est plus hydrophobe que le Dieldrin, lui-même plus hydrophobe que l'Heptachlor (DDT > Dieldrin > Heptachlor). Or l'ordre d'adsorption de ces composés sur de l'illite, de la kaolinite ou de la montmorillonite est modifié : on a DDT > Heptachlor > Dieldrin. En effet, l'analyse tridimensionnelle de ces molécules montre que le DDT possède majoritairement une structure plane, ce davantage que l'Heptachlor, lui-même davantage que le Dieldrin (Huang and Liao, 1970).

### II.1.6 - La coordination

La coordination est la formation d'une liaison forte entre une molécule organique donneuse d'électrons et des cations adsorbés accepteurs d'électrons. Le résultat net est un recouvrement partiel des orbitales et un échange partiel de la densité électronique. Les liaisons de coordination s'établissent entre des atomes donneurs d'électrons (S, N, O) contenus dans la molécule, des molécules organiques riches en orbitales de type p, et des métaux de transition (Fe, Al, Ca, ...). Ces liaisons mettent en jeu des énergies très élevées.

## II.2 - Estimation des coefficients d'adsorption

L'adsorption, en général réversible, est définie comme l'accumulation d'un produit chimique sur la surface du sol :



$C_s$  = concentration adsorbée sur le sol (g/kg de sol)

$C_e$  = concentration dans l'eau (g/m<sup>3</sup>)

$k_{des}$  = constante de désorption

$k_{ads}$  = constante d'adsorption

L'outil le plus simple pour exprimer mathématiquement la distribution d'un produit chimique entre le sol et l'eau est le coefficient d'adsorption (ou de distribution),  $K_d$ , défini comme le rapport :

$$K_d = C_s/C_e \text{ (en m}^3\text{/kg)}$$

Plus l'adsorption est élevée ( $C_s \gg C_e$ ), plus la valeur de  $K_d$  est élevée.

Des chercheurs ont montré que la normalisation de  $K_d$  par rapport à la teneur du sol en matière ou en carbone organique permet d'éliminer les variations de  $K_d$  en fonction du sol.

$$K_{om} = K_d/om$$

$$K_{oc} = K_d/oc$$

où :

$K_{om}$  = coefficient d'adsorption normalisé par la teneur en matière organique  
 $K_{oc}$  = coefficient d'adsorption normalisé par la teneur en carbone organique  
 om = teneur en matière organique du sol ( $\mu\text{g}$  de matière organique / g de sol)  
 oc = teneur en carbone organique du sol ( $\mu\text{g}$  de carbone organique / g de sol)

La relation entre om et oc est supposée constante :

$$K_{oc} = 1,724 K_{om} \quad (\text{Dragun, 1988}).$$

Des valeurs de  $K_{om}$  et  $K_{oc}$  ont été mesurées pour de nombreux polluants et sols. Une liste non-exhaustive est donnée Tableau II.2-a :

Produit	$K_{oc}$	$K_{om}$	Références bibliographiques
<b>Anthracène</b>	26.000		Karickhoff et al., 1979
<b>Benzène</b>		18	Chiou et al., 1983
<b>1,2;5,6-dibenzanthracène</b>	2.029.000		Means et al., 1980
<b>Naphtalène</b>	1.300		Karickhoff et al., 1979
<b>Phénanthrène</b>	23.000		Karickhoff et al., 1979
<b>Pyrène</b>	62.700 84.000		Means et al., 1980 Karickhoff et al., 1979
<b>Tétracène</b>	650.000		Karickhoff et al., 1979

**Tableau II.2-a :** Valeurs de  $K_{oc}$  et  $K_{om}$  pour quelques polluants organiques dans des sols.

Dans de nombreux cas, où il n'est pas possible de mesurer précisément  $K_d$ ,  $K_{om}$  ou  $K_{oc}$ , une estimation peut être nécessaire.

Des chercheurs ont montré que l'adsorption des produits chimiques non-ioniques sur les particules de sol est corrélée avec deux mesures empiriques de l'hydrophobie de ces produits : la solubilité dans l'eau,  $S_w$ , et le coefficient de partage octanol/eau,  $K_{ow}$  (Tableau II.2-b).

Il est toutefois important de connaître les limites d'utilisation de ces équations, qui ne sont pas universelles :

- elles ont été développées en supposant l'hydrophobie l'unique facteur d'accumulation des produits chimiques sur les sols. Il est donc nécessaire d'étudier la structure de la molécule avant de les appliquer,
- elles sont en général valides pour des molécules de poids moléculaire inférieur à 400,
- elles ont été établies avec des sols de teneurs en carbone organique voisines de 0,1%,
- elles ne prennent pas en compte les contributions potentielles des minéraux à l'adsorption des molécules organiques,
- elles ne prennent pas en compte que la matière organique du sol varie en composition et en structure chimique selon les sols,
- elles ne prennent pas en compte les erreurs dues à l'hypothèse de l'existence d'isothermes d'adsorption linéaires aux fortes concentrations de produits chimiques dans les sols,
- la valeur de  $K_{oc}$  pour un produit chimique donné est supposée constante pour ce produit. Or, ce n'est pas toujours le cas, comme pour l'alphanaphtol ( $K_{oc}$  de 328 à 15.618).

- ces équations ne prennent pas en compte la dépendance du coefficient d'adsorption par rapport à la salinité de l'eau, approchée par l'équation de Setschenow (Karickhoff, 1984) :

$$\log (K_d I_2 / K_d I_1) = K_s (I_2 - I_1)$$

$I_1, I_2$  = concentrations aqueuses en sels (mole/litre)

$K_s$  = constante de Setschenow pour un sel donné (0,16 litre/mole pour NaCl).

	% de carbone (% oc) ou de matière (% om) organique du sol	Références bibliographiques
$\log K_{oc} = -0,54 \log S_w$ (fraction molaire) + 0,44 $\log K_{oc} = \log K_{ow} - 0,21$	% oc : 0,09 à 3,29	Karickhoff et al., 1979
$\log K_{oc} = -0,82 \log S_w$ (en ppm) + 4,07	% oc : 0,11 à 2,38	Means et al., 1980
$\log K_{ow} = -0,594 \log S_w$ (fraction molaire) - 0,197 $\log K_{oc} = 0,989 \log K_{ow} - 0,346$	% oc : 0,66 à 2,38	Karickhoff, 1981
$\log K_{om} = 0,52 \log K_{ow} + 0,69$	% om : 0,19 à 0,662	Briggs, 1981
$\log K_{oc} = -0,55 \log S_w$ (mg/l) + 3,64 $\log K_{oc} = 0,544 \log K_{ow} + 1,377$	% oc : non spécifié	Tan, 1978

**Tableau II.2-b** : Quelques équations permettant d'approcher  $K_{oc}$  et  $K_{om}$  dans des sols.

### II.3 - La mobilité des molécules organiques dans le sol

Des modèles mathématiques relativement simples basés sur le coefficient d'adsorption,  $K_d$ , ont été développés. Ces modèles donnent des informations plutôt fiables concernant la migration des produits chimiques dans les sols.

#### II.3.1 - L'équation de retardation

L'équation de retardation est l'équation la plus communément acceptée et utilisée pour une estimation globale du taux de migration d'un polluant dans les systèmes sol-eau souterraine (Dragun, 1988).

$$V_c = V \cdot (1 + K_d \cdot (b/P_T))^{-1}$$

où :

$V_c$  = la vitesse du produit chimique au point  $c/c_0=0,5$  où  $c$  est la concentration en polluant et  $c_0$  la concentration initiale en polluant.

$V$  = vitesse moyenne de l'eau souterraine

$K_d$  = coefficient de distribution ( $m^3/kg$ )

$b$  = densité du sol ( $kg/m^3$ )

$P_T$  = porosité totale du sol ( $m^3/m^3$ )

L'équation de retardation peut être modifiée pour une utilisation dans la zone insaturée du sol (Baes and Sharp, 1983).

$$V_c = V_{sw} \cdot (WC + bK_d)^{-1}$$

où :

$V_{sw}$  = vitesse de l'eau du sol percolant à travers la zone insaturée (mm/an)

WC = teneur volumétrique en eau du sol ( $\text{m}^3/\text{m}^3$ )  
 b = densité du sol ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

### II.3.2 - Le modèle de mobilité convective

Ce modèle mathématique a été développé pour estimer la mobilité convective des produits chimiques ayant un partage linéaire équilibré entre les phases vapeur, liquide et adsorbée dans la zone insaturée du sol (Jury et al., 1983, 1984).

Un indicateur utile est le temps de convection,  $t_c$ , pour avancer d'une distance  $d$  :

$$t_c = d \cdot (b \cdot K_d + WC + P_{sa} \cdot K_H) / WF$$

où :

b = densité du sol ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )  
 $K_d$  = coefficient de distribution ( $\text{m}^3/\text{kg}$ )  
 WC = teneur volumétrique en eau du sol ( $\text{m}^3/\text{m}^3$ )  
 $P_{sa}$  = teneur volumétrique en air du sol ( $\text{mol}/\text{m}^3/\text{atm}$ )  
 $K_H$  = constante de Henry ( $\text{atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$ )  
 WF = flux d'eau ( $\text{m}^3/\text{m}^2/\text{s}$ , soit  $\text{m}/\text{s}$ )

Quand l'adsorption est relativement élevée ( $K_d > 4 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3/\text{kg}$ ), WC,  $P_{sa}$  et  $K_H$  peuvent être négligés et  $t_c$  est proportionnel à  $K_d$  et b.

On a alors :  $t_c = d \cdot b \cdot K_d / WF$ .

On définit  $R = V_w / V_c$ , le facteur de retardation ( $V_w$  est la vitesse moyenne de l'eau). Si  $R > 1$ , alors le constituant se déplace dans le sol moins vite que l'eau.

## II.4 - La nature de la solution de sol

Elle agit surtout sur l'hydrosolubilité des produits chimiques introduits dans le sol.

### II.4.1 - Sa composition

Elle a un effet sur les processus de rétention, soit par des variations de force ionique, soit par la présence de composés particuliers.

Une augmentation de force ionique peut avoir des effets différents suivant la nature du produit chimique étudié : la solubilité de molécules neutres ou faiblement basiques diminue, alors que celle des molécules faiblement acides augmente (Green and Karickhoff, 1990) grâce à l'effet du sel. Toutefois, lorsque la force ionique est élevée, la solubilité diminue généralement, car il se crée un phénomène d'exclusion de la phase aqueuse ou de précipitation et les interactions avec les surfaces sont favorisées.

La présence de composés organiques dissous dans la solution de sol a un effet prépondérant sur le comportement de certaines molécules. Ainsi, la présence de cette matière organique, qui a des caractéristiques similaires à celles des acides humiques ou fulviques, provoque la création de liaisons hydrophobes entre la matière organique et les molécules polluantes (Koskinen and Harper, 1990). Ces molécules passent donc d'une forme adsorbée à une forme mobile, potentiellement plus dangereuse (Sposito, 1989).

### II.4.2 - Sa température

La solubilité des molécules organiques est en général augmentée avec la température de la solution de sol, ce qui entraîne une diminution de leurs interactions avec les surfaces.

Cette généralisation est toutefois infirmée par différents exemples dans la littérature comme par exemple, l'affinité des argiles pour l'atrazine qui augmente avec la température (Dragun, 1988).

Aussi, il serait osé de trop généraliser l'effet de la température sur les interactions sol-polluants, trop de phénomènes étant modifiés de manière parfois contraire par les changements de température dans le sol.

#### **II.4.3 - Son pH**

C'est un des principaux paramètres gouvernant les interactions solide-liquide des molécules ionisées, en faisant varier leur solubilité, mais encore des molécules neutres en modifiant les charges des surfaces organiques ou minérales. Les effets du pH sur les processus de rétention sont complexes et peuvent être directs ou indirects.

Dans le cas des molécules ionisées acides ou basiques, on observe un effet direct, les modifications de pH entraînant des changements de concentrations entre les formes neutres et les formes ionisées. Une variation de pH aura un effet inverse sur la solubilité d'une molécule acide et d'une molécule basique. Les molécules neutres, ayant une plus grande affinité pour les matrices solides et surtout la matière organique, seront retenues de manière indépendante du pH par les sols.

Un effet indirect du pH par modification de la composition du sol peut aussi avoir lieu : la solubilisation de matière organique peut être induite par l'augmentation du pH (Nkedi-Kizza et al., 1985). L'hydrosolubilité des composés hydrophobes sera alors augmentée de manière indirecte.

#### **II.4.4 - Sa teneur en eau**

La majorité des mesures d'adsorption est réalisée sur des suspensions très diluées, donc des conditions éloignées de la réalité au niveau des proportions eau-sol. Ces proportions influent naturellement sur l'état d'agrégation du sol, l'acidité et l'accessibilité des surfaces, mais encore sur le potentiel redox et l'aération, paramètres influençant les processus de rétention.

Aussi ces techniques de mesures conduisent à une surestimation de la capacité d'adsorption réelle du sol considéré, mais permettent d'avoir accès aux capacités maximales d'adsorption du sol. Elles servent de base de comparaison des comportements des polluants étudiés.

### **II.5 - La nature de la matrice solide : les minéraux et la matière organique**

#### **II.5.1 - Les argiles**

Ce sont des aluminosilicates plus ou moins altérés, dont les principales caractéristiques sont leur grande surface spécifique, qui leur confère de fortes capacités d'échange cationique, et leurs propriétés colloïdales (Sposito, 1989).

Les argiles les plus étudiées (les plus répandues) sont la kaolinite, la montmorillonite et l'illite, dont les caractéristiques de surface et d'échange ionique sont différentes. Elles ont donc des interactions différentes avec les composés organiques (Koskinen and Harper, 1990).

En plus des surfaces spécifiques de chaque type d'argile, la nature de l'ion compensateur est importante car ces ions, de propriétés différentes, réagiront différemment avec les composés organiques. Ces ions peuvent être des sites d'adsorption privilégiés pour

les pesticides, entrer en compétition pour des sites d'interactions, et former des complexes argiles-hydroxydes très réactifs.

### **II.5.2 - Les oxydes et les hydroxydes cristallins**

On y compte les oxydes de silicium, le quartz et la cristobalite ayant des capacités d'adsorption très faibles, voire nulles (Lee et al., 1990). A l'opposé, les oxydes et hydroxydes métalliques peuvent présenter des capacités d'adsorption non négligeables, en particulier dans le cas des acides faibles comme les phénols.

### **II.5.3 - Les oxydes et les hydroxydes amorphes**

Ces minéraux sont souvent associés à des oxydes ou hydroxydes cristallisés ou enrobés autour des argiles. Ils proviennent le plus souvent de leur altération (Sposito, 1989). Les oxydes et les hydroxydes de fer sont des minéraux secondaires au même titre que les argiles et se déposent principalement sur les kaolinites.

Les oxydes et les hydroxydes de fer et d'aluminium jouent un rôle très important dans la fixation des pesticides ionisés, ou pouvant engager des liaisons hydrogène, car ils sont très riches en groupements -OH.

### **II.5.4 - Les carbonates**

Le carbonate de calcium se manifeste sous des formes granulométriques variables dans la plupart des sols de pH supérieur à 7.

L'adsorption d'anions organiques (acides aliphatiques, acides fulviques) ou inorganiques (groupements phosphate) a été montrée sur différentes matrices carbonatées. Comme il s'agit d'interactions ioniques, les possibilités de désorption des composés organiques par des variations locales de pH ou par la destruction de la surface du carbonate sont importantes.

### **II.5.5 - Les constituants organiques**

Dans les couches de surface de l'écorce terrestre constituant les sols, on trouve de la matière organique vivante ou non. Parmi les composés de la matière non vivante, on distingue les composés humiques et les composés non humiques.

Ces derniers sont constitués de débris végétaux en voie de décomposition et comprennent des produits connus comme des protéines, des sucres et des acides aminés.

Les composés humiques, issus de l'humification des composés précédents, ont des structures chimiques variables et mal connues. On distingue les acides fulviques, les acides humiques et l'humine, mais ils possèdent tous les mêmes groupements fonctionnels (-COOH, -OH, -NH<sub>2</sub>) extrêmement réactifs (Flaig et al., 1975). Comme les argiles, les composés humiques possèdent des propriétés colloïdales, avec des surfaces spécifiques et des capacités d'échange cationique souvent très importantes (Sposito, 1989).

La multitude des groupements fonctionnels, la variété des sites hydrophobes et hydrophiles et les propriétés colloïdales font que les composés organiques sont considérés comme les sites d'interaction prépondérants pour la majorité des polluants organiques (Chiou et al., 1979). Certains auteurs estiment que les interactions avec les autres constituants pourront être négligées au-delà de 2% de matière organique dans un sol (Karickhoff, 1984 ; Green and Karickhoff, 1990).



### **II.5.6 - La structure du sol**

Comme la texture, la structure du sol influe directement sur le comportement des polluants, essentiellement à cause de la distribution de la porosité du sol en micro- et macroporosité. Cette distribution est issue de l'agrégation des particules solides par l'intermédiaire de liants (argiles et humus), et dépend de la distribution granulométrique de ces particules solides.

La distribution de la porosité influe directement sur le comportement physique du sol, et en particulier sur les processus de transfert, donc sur les interactions avec les produits chimiques, en faisant apparaître des cinétiques de diffusion dans la microporosité.

Cette diffusion limite, voire empêche, les interactions solide-liquide suivant les temps caractéristiques de transfert.

### CHAPITRE III :

## LA POLLUTION DES SITES D'ANCIENNES USINES A GAZ ET LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

Nous nous intéresserons plus particulièrement non seulement à l'impact de ces pollutions sur la microflore indigène du sol, mais surtout aux voies biologiques de dépollution et de détoxification de composés impliqués dans la pollution des sites d'anciennes usines à gaz, les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

### III.1 - Les origines de la pollution

L'histoire des trois branches principales de l'industrie de l'exploitation de la houille, la production de gaz, la production de charbon et la distillation de la houille, a suivi le même schéma : croissance régulière du début du 18<sup>ème</sup> siècle pour atteindre son maximum en 1950-1960, puis déclin régulier au fur et à mesure de l'introduction de nouvelles sources de gaz et du déclin de l'industrie de l'acier.

Les procédés de combustion de la houille ont été identiques durant toute la période d'exploitation : elle était chauffée dans une atmosphère déficiente en oxygène, menant à un mélange de produits gazeux et liquides et produisant le charbon comme résidu solide. Les produits volatils étaient alors séparés, produisant du gaz, de la liqueur ammoniacale et du goudron. Le gaz était alors purifié en éliminant l'ammoniac, les composés sulfurés et cyanurés, avant stockage et distribution (E.R.L., 1987).

La liqueur ammoniacale était un liquide aqueux hautement pollué, contenant de l'ammoniac, des phénols, des cyanures et du sulfate. Son traitement et son stockage étaient déjà un problème pendant l'exploitation de l'industrie.

Le goudron était produit sur tous les sites. Sa composition pouvait considérablement varier, mais comprenait de fortes concentrations en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), en même temps que de faibles concentrations en composés aromatiques et aliphatiques volatils.

Le principal résidu solide était « l'oxyde épuisé », le résidu restant après l'utilisation de l'oxyde de fer pour éliminer le sulfure d'hydrogène et les autres contaminants du gaz. La régénération de l'oxyde permettait son utilisation plusieurs fois jusqu'à ce qu'il contienne environ 50% de sulfures libres et quelques pourcents de cyanures complexés.

Ces 3 sous-produits étaient souvent utilisés dans la production, respectivement, d'ammoniac, de produits de la houille et de produits organiques, et d'acide sulfurique. Toutefois, leur présence peut avoir résulté en la contamination du sol du site d'exploitation par différents moyens : décharge, fuites et pertes au cours du stockage et de la manutention, produits encore présents dans l'usine quand elle a fermé et produits laissés dans les tuyaux souterrains et les réservoirs de stockage (Thomas et al., 1991 ; Thomas and Lester, 1993a).

Or ces anciennes usines sont souvent situées à des emplacements " stratégiques " : autrefois à la périphérie des villes, elles se trouvent maintenant au coeur de la zone urbaine. Sans parler nécessairement de danger immédiat pour les populations, l'urbanisme galopant n'est pas sans poser de problèmes : les terrains occupés par ces usines désaffectées sont inutilisables tels quels, et représentent un manque à gagner pour leurs détenteurs ainsi que pour les professionnels de l'immobilier. Leur valeur marchande est en effet nulle en regard de la pollution présente. C'est sans doute l'élément déterminant, avec les lois sur la qualité de

l'environnement concernant les transactions immobilières, qui a provoqué l'intérêt actuel pour la dépollution de ces sites (Ministère de l'environnement, 1994).

### III.2 - Caractérisation de la pollution sur les sites d'anciennes usines à gaz

#### III.2.1 - Les goudrons

Les cibles critiques seront en général les enfants et les jardiniers, qui sont les deux groupes entrant le plus souvent en contact avec le sol. Pour poser un problème d'empoisonnement aigu, des niveaux de goudron de 200 g/kg de sol devraient être présents pour un enfant avalant une bouchée de 5 g de sol. Il a été estimé qu'un contact régulier de la peau humaine avec un sol contenant plus de 500 mg/kg de HAP peut constituer un risque chronique significatif en termes de potentialité de cancer de la peau. 500 mg/kg de HAP est en général donné pour équivalent de 5 mg/kg de benzo(a)pyrène (E.R.L., 1987).

Les composants principaux des goudrons sont les HAP (au moins 50 % du produit). Pour des raisons analytiques, qui incluent la persistance des HAP dans les sols, il est commode d'utiliser les HAP comme marqueurs de la pollution par les goudrons. Une autre raison de ce choix est qu'un risque chronique dû à une exposition à long terme aux HAP, à de faibles niveaux, par la peau ou par ingestion, représente le risque le plus sérieux, parmi les risques pour l'homme, associé aux sols contaminés par des goudrons (E.R.L., 1987 ; Thomas and Lester, 1993a).

Les HAP sont des composés organiques neutres apolaires, constitués de noyaux benzéniques (deux ou plus) fusionnés par des arrangements linéaires, angulaires ou en coin. Ils sont généralement groupés selon la liste de l'agence américaine pour la protection de l'environnement (US E.P.A.) des polluants prioritaires (Tableau III.2.1-a). Cette liste contient des produits, dont la taille varie de 2 à 6 noyaux benzéniques cancérigènes ou suspectés de l'être (Andrews et al., 1978 ; Sims et al., 1988 ; Fujikawa et al., 1993).

Nom	Nombre de cycles
Naphtalène	2
Acénaphthylène, Acénaphène, Fluorène, Phénanthrène, Anthracène	3
Fluoranthène, Pyrène, Benzo(a)anthracène*, Chrysène*	4
Benzo(b)fluoranthène*, Benzo(k)fluoranthène*, Benzo(a)pyrène*, Dibenzo(a,h)anthracène	5
Benzo(g,h,i)pérylène, Indéno(1,2,3-cd)pyrène*	6

Tableau III.2.1-a : Les 16 HAP cibles selon l'US E.P.A.. \* : suspectés d'être cancérigènes.

Le seuil critique proposé est 50 mg/kg de sol pour les utilisations comme les jardins, lotissements et les zones de jeu contre 1.000 mg/kg pour les zones de paysage où le contact avec la peau n'est pas possible, les immeubles et les couvertures imperméables (pas de contact régulier avec la peau, ni d'ingestion possibles). Le seuil d'action proposé est 500 mg/kg de sol pour la première catégorie d'utilisations précédemment décrites et 10.000 mg/kg de sol pour la seconde (E.R.L., 1987).

### III.2.2 - Les autres pollutions

Les **métaux lourds** peuvent contaminer les sites d'usines à gaz à des degrés variables (Thomas et al., 1991 ; Thomas and Lester, 1993a). Les micro-organismes sont sensibles à la pollution par les métaux lourds et leur exposition peut résulter en une réduction de la quantité et de la diversité du biotope, ou encore en le développement de populations microbiennes résistantes aux métaux. L'influence des métaux lourds sur les processus microbiens dépend de la concentration du métal disponible, ou partiellement disponible, plutôt que de la concentration totale.

Les **phénols** sont des composés homologues constitués de produits substitués du phénol (Thomas and Lester, 1993b). La plus basse concentration de phénols dans le sol pouvant causer un problème de santé humaine est 2000 mg/kg (E.R.L., 1987).

Les niveaux de bruit de fond des phénols dans le sol excèdent rarement 1mg/kg de sol sec à cause de la présence dans le sol, les sédiments et les effluents de micro-organismes capables d'utiliser les phénols comme sources de carbone (E.R.L., 1987 ; Mueller et al., 1989a ; Ambujom and Manilal, 1995).

Les **cyanures complexés**, les **thiocyanates**, les **cyanures libres**, les **sulfates**, les **sulfures** et le **soufre libres** sont les produits cibles de la pollution par "l'oxyde épuisé".

Les cyanures complexés sont généralement choisis comme marqueurs de cette pollution. En effet, la majeure partie des cyanures est présente sous une forme complexée de sels ferreux ou ferriques ou de ferrocyanure ferrique comme le bleu de prusse, qui se caractérise par un bleu « flamboyant » (Thomas and Lester, 1993a). Les **ferro/ferricyanures** et les **thiocyanates** sont relativement non toxiques (E.R.L., 1987). Les **cyanures libres** (solubles dans l'eau) ne représentent que 0,1% des cyanures présents (Thomas and Lester, 1993a). La cible critique concernée par la contamination du sol par les cyanures libres est l'homme.

Des teneurs en **sulfates** jusqu'à 20% ont été observées sur des sites d'anciennes usines à gaz. Les cibles critiques de cette pollution sont les plantes et les matériaux du bâtiment (E.R.L., 1987). Les problèmes liés aux **sulfures** dépendent à la fois de la forme physique et chimique présente et de l'acidité du sol. Ici, la forme principale est en général du sulfure ferreux insoluble (E.R.L., 1987). Le **soufre** est faiblement toxique et ses effets en deçà de la dose létale sont similaires à l'action laxative en utilisation médicale à des doses orales de 1 à 4 g. Des niveaux de soufre jusqu'à 2% ont déjà été observés sur un certain nombre de sites (E.R.L., 1987).

### III.3 - Population microbienne

Les contaminants typiques, dont les cyanures et les HAP, rencontrés sur ces sites existent à l'état naturel, mais ils sont présents sur ces sites à des concentrations anormalement élevées. De ce fait, les mécanismes microbiens nécessaires à leur biodégradation peuvent déjà exister. Toutefois, une acclimatation peut être nécessaire ; elle prendra la forme d'une augmentation du nombre de micro-organismes dégradant les contaminants, ou de l'acquisition de nouvelles capacités métaboliques venant de modifications génétiques, ou encore de l'augmentation de la quantité d'enzymes nécessaires à la transformation (cf. I.4.1).

Il faut également préalablement s'assurer que le sol contaminé possède une communauté viable de micro-organismes pour accomplir la biodégradation des polluants

présents sur le site. En effet, si la pollution s'est avérée toxique pour les micro-organismes (concentration létale de polluants), alors aucune population microbienne n'est susceptible de se développer.

Les différents facteurs susceptibles d'influencer les populations microbiennes des sols et leurs activités ont été décrits au I.3.

### III.4 - Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques : caractéristiques, biodégradation

Ces hydrocarbures se rencontrent essentiellement dans les produits complexes formés lors de la combustion incomplète ou de la pyrolyse de matériaux organiques. Ainsi, ils sont présents dans les suies et fumées de toutes origines, dans les gaz d'échappement des moteurs à explosion, dans la fumée de cigarette, etc... On les trouve à des concentrations très diverses dans le goudron de houille et ses dérivés (huiles anthracéniques et brai), dans les huiles minérales, les extraits aromatiques, le bitume et les paraffines brutes tirés du pétrole, dans le noir de carbone, dans les huiles de schiste et dans l'asphalte naturel. Cette liste n'est pas exhaustive (INRS, 1979, 1984).

#### III.4.1 - Structure et propriétés physico-chimiques

Les HAP sont des composés organiques neutres apolaires, constitués de noyaux benzéniques (deux ou plus) fusionnés par des arrangements linéaires, angulaires ou en coin (Figures III.4.1-a et III.4.1-b)

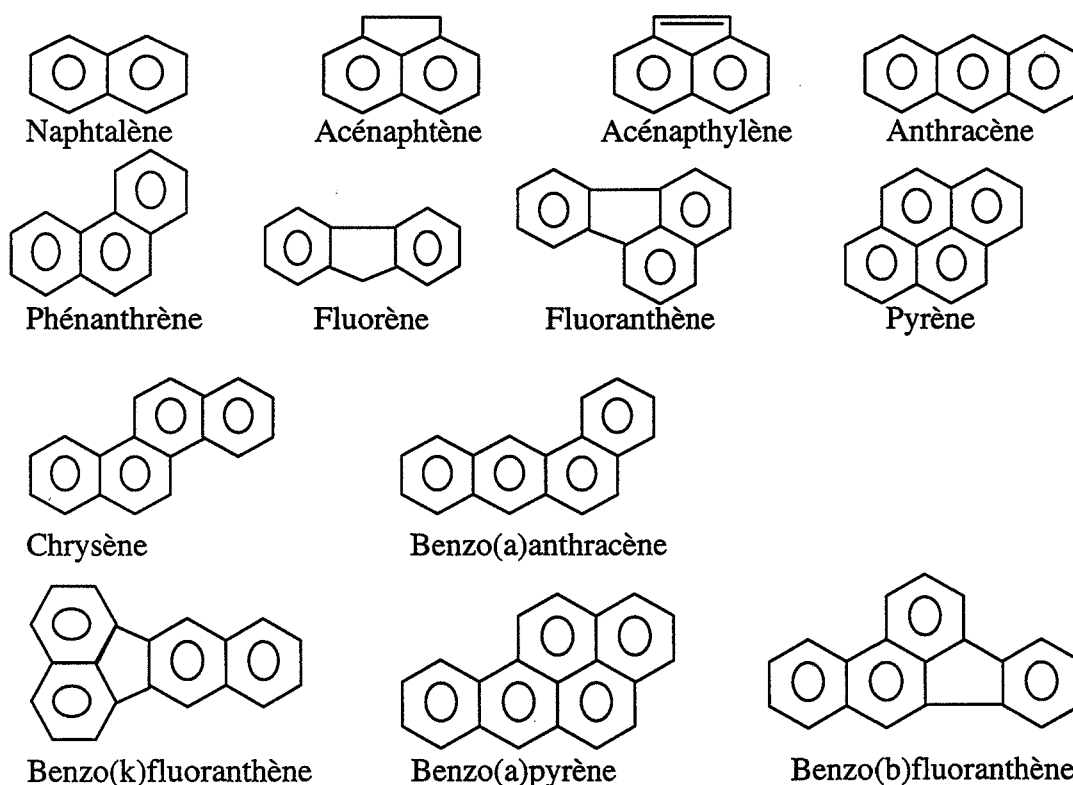


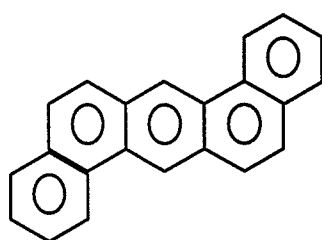
Figure III.4.1-a : Formules brutes et formules développées de HAP de 2 à 5 cycles.

Ils diffèrent par leurs propriétés physico-chimiques : les HAP de faible poids moléculaire sont plus volatils, plus solubles dans l'eau et moins lipophiles que les HAP de fort poids moléculaire (Tableau III.4.1-a).

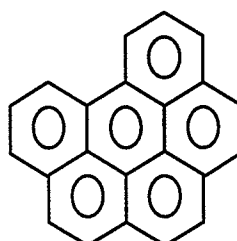
	Mp (°C)	bp (°C)	K <sub>ow</sub> (atm.m <sup>3</sup> /mol)	logK <sub>ow</sub>	logK <sub>ow</sub>	S <sub>w</sub>	vp (mm Hg)
Naphtalène	80,5	217,94	7,34.10 <sup>-4</sup> @25°	2,72 à 3,52	3,20 à 4,70	30 mg/l @25°	5,4.10 <sup>-2</sup> @25°
Acénaphtylène	92-93	280	1,5.10 <sup>-4</sup> @20°	3,68	4,07	3,93 mg/l	2,9.10 <sup>-2</sup> @20°
Acénaphthène	89,9	279	1,5.10 <sup>-4</sup> @20°	1,25	3,92 à 4,33	3,47-4,16 mg/l @25°	1,55.10 <sup>-3</sup> @25°
Fluorène	116-117	298	6,3.10 <sup>-5</sup> @20°	3,70	4,12 à 4,38	1,685 mg/l @25°	6.10 <sup>-4</sup> @25°
Phénanthrène	100,5	340	2,35.10 <sup>-5</sup> @25°	3,72 à 4,59	4,16 à 4,57	0,994 à 1,29 mg/l @25°	2,1.10 <sup>-4</sup> @20°
Anthracène	214-217	340	6,59-7,66.10 <sup>-5</sup>			0,07mg/l	7,6.10 <sup>-6</sup>
Fluoranthène	107	375	1,69.10 <sup>-2</sup> @25°	4,62	5,15 à 5,20	166 µg/l @20°	5,0.10 <sup>-6</sup> @20°
Pyrène	156	393	1,87.10 <sup>-5</sup>	4,66 à 5,23	4,88 à 5,52	135 µg/l @25°	2,5.10 <sup>-6</sup> @25°
Benzo(a)anthracène	155-162	400	6,6.10 <sup>-7</sup>	6,14	5,61 à 5,91	9,4-16,8 µg/l	5.10 <sup>-9</sup> @20°
Chrysène	258,2	448	7,26.10 <sup>-20</sup> @20°	5,39	5,60 à 5,91	1,8-6 µg/l @25°	6,3.10 <sup>-2</sup> @20°
Benzo(b)fluoranthène	163-165		1,2.10 <sup>-5</sup> @20-25°	5,74	6,57	1,2 µg/l	5.10 <sup>-2</sup> @20°
Benzo(k)fluoranthène	217	480	1,04.10 <sup>-3</sup> @20°	6,64	6,85	0,55 µg/l @25°	9,59.10 <sup>-11</sup> @25°
Benzo(a)pyrène	181,3	495	<2,4.10 <sup>-6</sup> @20°	5,60 à 6,29	5,81 à 6,50	3,8 µg/l @25°	2,4-5,6.10 <sup>-9</sup> @20°
Dibenzo(a,h)anthracène	269-270	524	7,33.10 <sup>-9</sup> @20- 25°	6,22	5,97 à 6,58	0,5 µg/l @25°	10 <sup>-10</sup> @20°
Benzo(ghi)pérylène	276,8	>500	1,4.10 <sup>-7</sup> @25°	6,89	7,10	0,26 µg/l @25°	1,01.10 <sup>-10</sup> @25°
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276,8		2,9.10 <sup>-7</sup>				

**Tableau III.4.1-a** : Quelques caractéristiques physico-chimiques des HAP étudiés (The Merck Index, 1989 ; Montgomery, 1991 ; Shiu and McKay, 1997).

Ces propriétés physico-chimiques déterminent largement le comportement des HAP dans l'environnement et indiquent que le transfert et le turnover des HAP de faible poids moléculaire seront plus rapides que ceux des membres des autres groupes.



Dibenzo(a,h)anthracène



Benzo(g,h,i)pérylène

**Figure III.4.1-b** : Formules brutes et formules développées de 2 HAP à 5 et 6 cycles.

### III.4.2 - Mécanismes de rétention dans les sols/sédiments

La structure des HAP les rend très stables dans l'environnement. La mobilité et la biodisponibilité des contaminants organiques dans les sols/sédiments dépendent de la concentration de ces composés dans les pores. Jusqu'à récemment, les modèles de transport des solutés estimaient la retardation du transport des contaminants par des processus de sorption (dus aux forces de Van der Waals pour les HAP et à leur caractère hydrophobe, cf. II.1.1 et II.1.2) et basés sur l'interaction contaminant-(sédiment/sol).

Karickhoff et al. (1979) ont décrit l'adsorption de différentes molécules hydrophobes, dont des HAP, sur des sédiments. Means et al. (1980) ont étudié le comportement de quatre HAP (pyrène, dibenzo(a,h)anthracène, 3-méthyl anthracène et diméthylbenzanthracène) sur quatorze sols et sédiments présentant des propriétés physico-chimiques très variées. Dans tous les cas, les constantes de partition,  $K_d$ , ont été corrélées de manière significative avec la teneur en matière organique des 14 substrats, alors qu'aucune corrélation n'était observée avec les autres propriétés physico-chimiques des sols/sédiments. Ils ont trouvé des relations linéaires significatives entre  $S_w$  et  $K_{oc}$  ( $K_{oc}=K_d/oc$ ),  $\log K_{oc} = -0,82 \cdot \log S_w + 4,070$ ,  $r^2=1,000$ , pour le pyrène, le dibenzo(a,h)anthracène, le 3-méthyl-anthracène et le diméthylbenzanthracène, relation en accord avec la relation générale  $\log K_{oc} = -0,686 \cdot \log S_w + 4,273$ ,  $r^2=0,933$  qui a été observée pour 22 composés.

Wilcock et al. (1996) ont étudié la persistance de seize HAP sur un sédiment de faible teneur en carbone organique. La plupart des changements de concentration en HAP avaient lieu dans les premiers centimètres de sédiment.

L'attention s'est tournée vers la capacité des colloïdes, des cosolvants et de la matière organique naturelle (NOM), qui agissent conceptuellement comme une autre phase dans la phase aqueuse, de lier les contaminants de manière à ce que leur transport à travers un aquifère puisse être accéléré par rapport au transport du contaminant isolé. Les HAP de faible poids moléculaire, modérément hydrosolubles (30 mg/l pour le naphthalène), ne persistent pas à des teneurs élevées dans les sédiments marins, mais la majorité des HAP de  $S_w < 1$  mg/l se lie aux sédiments et à la matière organique en suspension.

Ainsi, Magee et al (1991) ont observé un transport facilité du phénanthrène à travers des sols naturels en la présence de matière organique naturelle (NOM) dérivée du sol et ont été capables de déterminer précisément l'expression du facteur de retardation réduit en modifiant son expression classique pour inclure les effets de la NOM.

Johnson et al. (1995a et 1995b) ont étudié la capacité de deux substances humiques, l'une issue d'une rivière, l'autre d'un sol, à faciliter le transport et à augmenter la désorption de HAP au cours du transport à travers des sédiments marins de faible teneur en carbone organique. Ils ont trouvé que les effets des substances humiques sont similaires sur le quartz et les sédiments (massifs ou non) pour le transport et la désorption des HAP. Les effets d'augmentation de la solubilité et de la facilité du transport sont plus grands pour les HAP les plus hydrophobes. Les acides humiques issus du sol ont provoqué une augmentation plus grande que ceux issus de la rivière, sans doute à cause de leur plus fort poids moléculaire (hydrophobie). Un transfert de masse des HAP des sédiments vers la NOM a été mis en évidence dès l'introduction de NOM.

Toutefois, la notion d'équilibre d'adsorption pour les composés non polaires comme les HAP est basée sur le fait que ces molécules sont introduites dans l'environnement sous une forme échangeable. Or les HAP ont en général deux sources : pyrogène ou pétrolière. Et il

n'est pas sûr dans la première origine, que les HAP associés aux particules de suie soient immédiatement échangeables. Ainsi, MacGroddy et al. (1996) ont étudié comparativement la désorption de sédiments de HAP (pyrène et phénanthrène) et de PCB, qui sont eux immédiatement disponibles, d'hydrophobies similaires. Ils ont ainsi conclu que seule une fraction du pyrène et du phénanthrène (1 à 40%) contenus dans les sédiments était disponible pour l'équilibre de partition, contre 100% pour les PCB. Ceci est important pour les prévisions de mobilité et de biodisponibilité des HAP dans l'environnement.

Les phénomènes de rétention des HAP dans les sols/sédiments sont donc essentiellement basés sur l'hydrophobie des HAP, leur hydrosolubilité, mais aussi sur la teneur en matière organique des sols, et encore sur les colloïdes, la matière organique naturelle en suspension et enfin sur l'origine de leur présence.

#### III.4.3 - Existence dans les sols de populations microbiennes naturellement adaptées à la biodégradation des HAP

Kiyohara et al. (1992) ont étudié la distribution naturelle de bactéries capables de métaboliser des HAP (biphényle, naphthalène, phénanthrène, anthracène, pyrène, chrysène) sur 700 échantillons de sols issus de routes, champs, montagnes, sites pétroliers, rivières, canaux. 23% et 27% des échantillons contenaient des bactéries dégradant le biphényle ou le naphthalène, contre 69% pour le phénanthrène, 6% pour l'anthracène et 7% pour le chrysène. Dans toutes les origines, ils ont trouvé des bactéries, mais la fréquence était plus grande dans les lieux à proximité d'activités humaines (routes, usines,...). Toutes les souches caractérisées après isolement étaient des bactéries Gram-négatives en forme de bâtonnets appartenant aux genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas* (les plus nombreuses), *Alcaligenes*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*.

Mahmoud and Rama Rao (1993) ont quant à eux étudié l'abondance microbienne et la dégradation de HAP (anthracène, phénanthrène, chrysène, pyrène, fluoranthène) dans des sols pollués. Ils ont observé une attaque préférentielle de l'anthracène et du phénanthrène (le plus rapidement dégradé), alors que le chrysène n'était pas du tout biodégradé. Les bactéries dominantes appartenaient aux genres *Pseudomonas*, *Agrobacterium* et *Bacillus subtilis*. Pour les champignons, ils ont mis en évidence *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium tordum*, ainsi que *Fusarium oxysporum* et *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma viride* et *Trichoderma harzanium*. Aucune communauté dominante n'était trouvée pour le chrysène.

Kästner et al. (1994) ont étudié l'existence de bactéries dégradant des HAP sur différents sols pollués en utilisant la méthode développée par Kiyohara et al. (1982). Ils ont mis en évidence des populations bactériennes capables de croître sur l'anthracène, le phénanthrène, le fluoranthène ou le pyrène de  $10^3$  à  $10^5$  UFC/g de sol sec dans les sols pollués par des HAP, mais n'ont pas trouvé d'isolat capable de croître sur le pérylène, le triphénylène, le benzo(a)pyrène ou le chrysène. Aucun organisme trouvé n'était capable de dégrader des HAP de 5 cycles ou plus, alors qu'aucun enrichissement préalable n'était nécessaire pour les HAP jusqu'à 4 cycles. Les Actinomycètes nocardioformes (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*) représentaient là la majeure partie de la microflore du sol capable de minéraliser complètement des HAP.

Ainsi, de nombreux micro-organismes capables de dégrader des HAP existent dans les sols, plus fréquemment sur les sites contenant des HAP. Ces micro-organismes appartiennent à des genres variés, les *Pseudomonas* ayant été particulièrement étudiées. Leurs capacités de



dégradation s'étendent à différents HAP, mais la biodégradation des HAP de 5 cycles et plus par des micro-organismes issus directement du sol n'a pas été mise en évidence. Selon différents auteurs, le phénanthrène est le HAP le plus facilement et rapidement biodégradé.

### III.5 - La biodégradation des HAP

#### III.5.1 - Schéma de la dégradation dans les sols : exemple du naphthalène.

La Figure III.5.1-a illustre quelques processus de pertes biotiques et abiotiques d'un polluant modèle, le naphthalène, dans un environnement contaminé hypothétique comprenant de l'eau, de l'air, des sédiments et du sol.

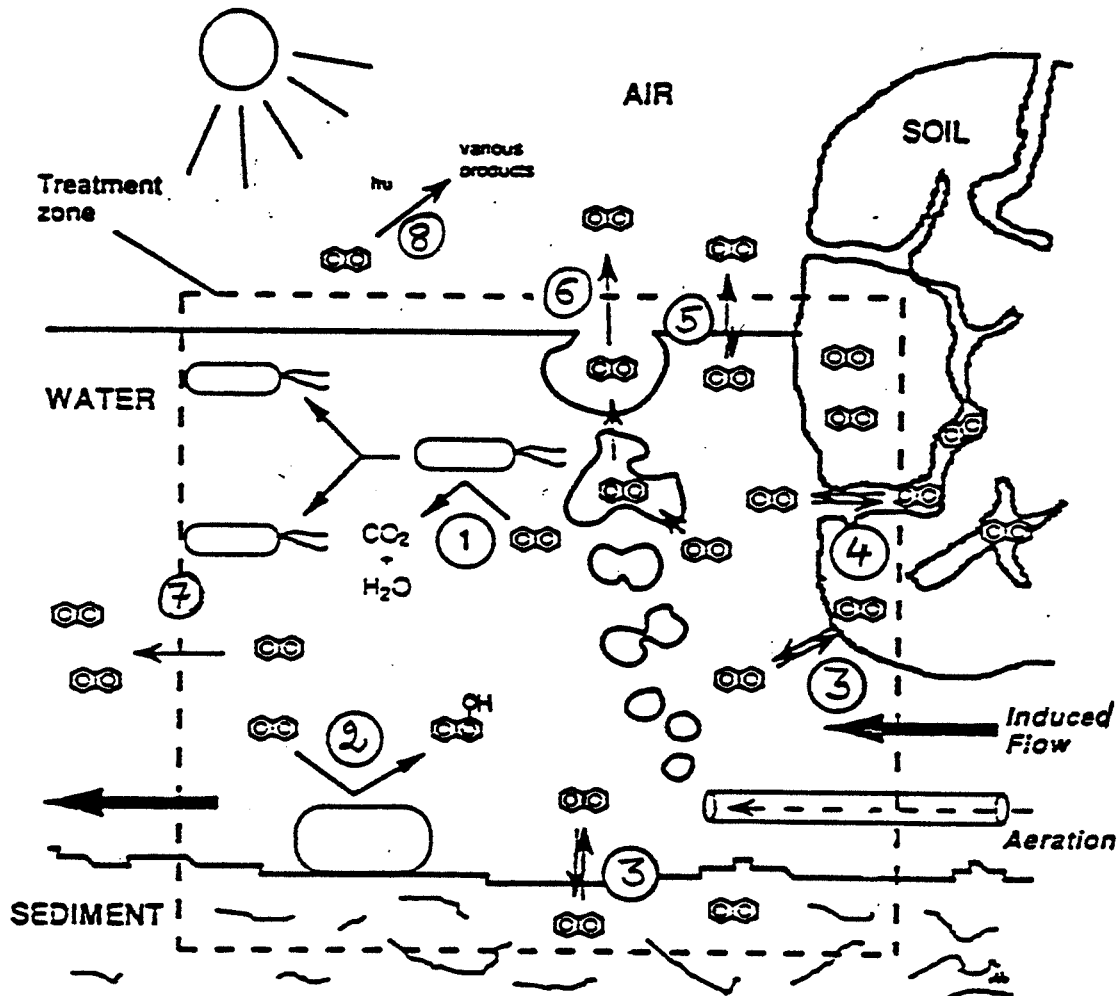


Figure III.5.1-a : Processus de pertes biotiques et abiotiques du naphthalène dans un environnement contaminé hypothétique (Heitzer and Sayler, 1993).

Huit processus sont ici représentés :

- (1) la biodégradation microbienne aérobie et la minéralisation résultant en la croissance des micro-organismes
- (2) la biotransformation microbienne aérobie et la formation d'intermédiaires toxiques
- (3) la sorption par les sols et les sédiments
- (4) les transferts de masse entre les particules

- (5) la volatilisation
- (6) le captage dû à l'aération
- (7) la dilution résultant du flux induit
- (8) la transformation et la dégradation par des radicaux produits photochimiquement.

L'importance relative des processus individuels dans chaque compartiment dépend des propriétés physico-chimiques du polluant et du site.

### **III.5.2 - Mise en évidence de la biodégradation au laboratoire**

De nombreux micro-organismes sont connus pour métaboliser les HAP de plus faible poids moléculaire comme le naphthalène, le phénanthrène, et l'anthracène. On connaît néanmoins le potentiel de biodégradation des HAP de poids moléculaire plus élevé comme le chrysène ou le benzo(a)pyrène.

La biodégradabilité des HAP dans l'environnement dépend de leurs propriétés physico-chimiques, de leurs concentrations et taux de diffusion dans le sol ou l'eau, et de leur biodisponibilité. Elle dépend également du type de sol, de la disponibilité de l'eau et de l'oxygène, de la présence de nutriments, de l'activité des populations microbiennes, des expositions antérieures aux produits chimiques, du pH, de la température et des effets saisonniers.

Nous nous intéressons ici dans un premier temps à la mise en évidence au laboratoire de la biodégradation des HAP dans des milieux liquides, puis dans des matrices solides, en particulier des sols.

#### III.5.2.1 - En milieu liquide

Les micro-organismes les plus décrits dans la littérature pour leurs capacités de dégradation des HAP sont les bactéries, mais les populations fongiques sont aussi d'importance, et même des algues ont été étudiées.

En ce qui concerne les bactéries, deux stratégies ont été développées : l'utilisation de souches bactériennes pures ou celle de cultures bactériennes mixtes. Dans les deux cas, les bactéries mises en évidence sont issues de sols contaminés par des HAP. Nous ne nous intéressons pas ici aux bactéries ayant acquis les capacités de dégradation par manipulation génétique, à cause des problèmes d'utilisation et de réglementation afférents (bien que les protocoles de sélection utilisés en laboratoire ne soient en fait que des modifications « naturelles » du patrimoine génétique des micro-organismes sélectionnés).

Mueller et al. (1989b) ont ainsi étudié l'action d'une communauté bactérienne composée de 7 souches différentes (2 cocci Gram-, 4 bacilles Gram- et 1 cocci Gram+) sélectionnée sur du fluoranthène comme seule source carbonée sur 16 HAP présents de manière significative dans les créosotes. Après 3 jours, 13 HAP sur 17 étaient en deçà de la limite de détection, les 4 autres atteignant le même résultat plus lentement. Ils ont ainsi mis en évidence une bonne capacité de dégradation du consortium sur une grande variété de HAP. Ils ont ensuite isolé une souche de ce consortium appartenant à l'espèce *Pseudomonas paucimobilis* et ont montré que cette souche préalablement poussée sur du fluoranthène possédait un spectre de dégradation des HAP plus large que lorsqu'elle était poussée en milieu complexe. Dans le premier cas, le fluoranthène induisait la production d'enzymes permettant une activité catabolique plus large (Mueller et al., 1990).

D'autres auteurs ont travaillé avec des communautés bactériennes mixtes. Ainsi, Gray et al. (1994) ont obtenu une culture mixte sélectionnée pour sa capacité à dégrader l'anthracène à partir d'un sol pollué par des créosotes. Ayant procédé à l'isolement des souches le constituant, ils ont remarqué que les isolats obtenus étaient moins efficaces que la culture mixte pour utiliser l'anthracène. Ces souches étaient au nombre de deux, l'une appartenant au genre *Pseudomonas*, l'autre au genre *Mycobacterium*.

Trzesicka-Mlynarz and Ward (1995) ont sélectionné également une culture bactérienne mixte pour sa capacité à dégrader le fluoranthène. Ils ont cherché à formuler différents milieux enrichis permettant de combiner une bonne croissance de la biomasse microbienne avec une dégradation du fluoranthène satisfaisante. Ainsi, une augmentation de la quantité de complexes azotés dans le milieu était favorable, alors qu'une modification des milieux par addition de glucose diminuait la dégradation du fluoranthène. Cette culture mixte pouvait dégrader d'autres HAP comme le benzo(a)pyrène, l'anthracène, le phénanthrène, l'acénaphène et le fluorène. Quatre isolats, tous des bacilles Gram-, ont été mis en évidence, dont 3 ont été identifiés comme *Pseudomonas putida*, *Flavobacterium* sp. et *Pseudomonas aeruginosa*. Par rapport à la culture mixte, ils dégradaient mieux les HAP les plus solubles dans l'eau (acénaphène, fluorène, phénanthrène et fluoranthène) et moins les HAP les moins solubles dans l'eau (anthracène, pyrène). En effet, le métabolisme collectif par des cultures mixtes de micro-organismes peut résulter en une utilisation accrue des HAP, car les produits intermédiaires de transformation par un micro-organisme peuvent servir de substrats pour le catabolisme et la croissance des autres (Keck et al., 1989) : phénomènes de commensalisme, de mutualisme ou de synergisme.

En ce qui concerne la dégradation de HAP par des souches bactériennes purifiées, la littérature est abondante. Komatsu et al. (1993) ont isolé une souche de *Pseudomonas* sp. capable de minéraliser l'acénaphène et l'acénaphylène. Une souche de *Rhodococcus* sp. a été isolée par Walter et al. (1991) sur du pyrène comme source carbonée. Elle était capable de le minéraliser à 72% en deux semaines, d'utiliser le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène comme autres sources de carbone, alors que le naphthalène, le dibenzofurane, le fluorène et le dibenzothiophène étaient seulement cométabolisés.

Boldrin et al. (1993) ont isolé une souche de *Mycobacterium* d'un sol d'ancienne usine à gaz. Elle était capable d'utiliser le phénanthrène, le pyrène et le fluoranthène comme source de carbone, de croître de manière exponentielle sur ces trois substrats solides en fermenteur, et de dégrader le fluorène par cométabolisme. Caldini et al. (1995) ont isolé une souche de *Pseudomonas fluorescens* capable de croître sur et de dégrader le chrysène, ainsi que le benzo(a)anthracène, le benzo(b)naphthothiophène mais pas la benzo(a)acridine. 4 souches bactériennes capables de croître sur du naphthalène, du phénanthrène ou un mélange de naphthalène et de phénanthrène ont été isolées d'un sol d'ancienne raffinerie par Ashok et al. (1995). Ils ont identifié les isolats comme appartenant aux genres *Micrococcus* pour 2 d'entre eux et aux genres *Pseudomonas* et *Alcaligenes* pour les deux autres.

Grifoll et al. (1995) ont isolé sur du fluorène une souche de *Pseudomonas cepacia* dont la croissance mène à l'assimilation d'environ 40% du carbone contenu dans le fluorène. Elle utilise d'autres composés polyaromatiques pour sa croissance (naphthalène, phénanthrène) et en transforme encore d'autres (biphényle, acénaphène). Juhasz et al. (1996) ont isolé 3 autres souches de *Pseudomonas cepacia* capables d'utiliser le fluorène, le phénanthrène et le pyrène comme source de carbone, mais encore le benzo(a)pyrène, le dibenzo(a,h)anthracène et le coronène. Ces souches sont capables de dégrader un mélange de HAP à 3, 4, 5 et 7

cycles, la dégradation des HAP de 5 et 7 cycles étant améliorée par la présence des HAP de faible poids moléculaire (sans doute s'agit-il du phénomène décrit par Keck et al., 1989).

Mais on n'observe pas toujours un effet d'augmentation de la dégradation des HAP de poids moléculaire élevé en présence de HAP de faible poids moléculaire.

En effet, Stringfellow and Aitken (1995), ayant isolé 2 souches de *Pseudomonas stutzeri* et de *Pseudomonas saccharophila* par enrichissement sur du phénanthrène comme source carbonée, ont étudié leur capacité à métaboliser d'autres HAP à 2 et 3 cycles. Ainsi, le naphthalène et les 1- et 2-méthyl-naphthalène étaient utilisés comme substrats de croissance alors que le fluorène était seulement cométabolisé. Ensuite, ils ont observé l'inhibition de l'utilisation du phénanthrène en présence des 4 composés, suggérant la transformation de plusieurs HAP par une enzyme commune dans les cellules entières et que le métabolisme compétitif est un phénomène courant parmi les organismes dégradant les HAP. De même, Shuttleworth and Cerniglia (1996) ont observé une inhibition de la dégradation du phénanthrène par 3 micro-organismes différents en présence de faibles concentrations en naphthalène.

Toutefois, Goyal and Zylstra (1996), après isolement de 3 souches de *Comamonas testosteroni* capables de dégrader le phénanthrène, ont conclu qu'il existait sans doute 2 groupes différents de gènes pour la dégradation du phénanthrène parmi ces 3 souches. Ceci montre la diversité qui existe dans les micro-organismes dégradant les HAP. Foght and Westlake (1996), ayant isolé une souche de *Pseudomonas fluorescens* capable de croître sur des HAP (naphthalène, phénanthrène, anthracène) et de dégrader de nombreux autres par cométabolisme, ont également mis en évidence un plasmide de 63 kilobases portant les gènes codant pour les enzymes nécessaires au phénotype de dégradation des HAP par cette souche.

Dans ce qui précède, nous n'avons pas évoqué les limites de la biodégradation par des micro-organismes. La plupart des études de biodégradation des HAP en milieu liquide décrites précédemment ont été réalisées avec des suspensions de cristaux de HAP dans le milieu de culture. Aussi, des auteurs se sont intéressés aux phénomènes physiques impliqués. Thomas et al. (1986) ont étudié les taux de dissolution et de biodégradation des composés faiblement solubles dans l'eau.

En effet, si un micro-organisme ne peut pas utiliser la forme insoluble d'un produit chimique, on peut s'attendre à ce qu'il métabolise d'abord le produit en solution et que le taux de transformation subséquent soit limité par le taux de dissolution. Ainsi, les taux de dissolution étaient inversement proportionnels à la taille des particules. Les taux diminuaient quand la taille augmentait, i.e. quand la surface de contact (ou de transfert) diminuait. De nombreux micro-organismes sécrètent des émulsifiants qui augmentent la surface disponible et les taux de dissolution spontanés ne semblaient être qu'un facteur gouvernant les taux de biodégradation. Ils en ont conclu que les micro-organismes peuvent utiliser un substrat faiblement soluble dans l'eau quand il se dissout spontanément, ou le métaboliser après une solubilisation biologiquement médiée ou par des mécanismes impliquant un contact physique avec la phase insoluble du substrat.

C'est ce qu'ont utilisé Caldini et al. (1995) pour mettre en évidence la biodégradation des HAP à 4 cycles par une souche de *Pseudomonas fluorescens* : ils ont artificiellement augmenté l'hydrosolubilité de ces composés par ajout d'acétonitrile dans le milieu de culture, donc augmenté la biodisponibilité, ce qui est comparable à ce qui se passe lors de l'addition de surfactants, et la biodégradation a alors pu être mesurée quantitativement.

Volkering et al. (1992) ont étudié la croissance d'une souche appartenant à *Pseudomonas* sp. sélectionnée sur le naphthalène, et capable de pousser sur le phénanthrène, l'anthracène et le fluoranthène, sur des HAP adsorbés ou sous forme de cristaux. Or il a été démontré que des cultures de bactéries pures ne peuvent utiliser le naphthalène et le phénanthrène que sous forme dissoute et donc que la dissolution du HAP solide est un prérequis à la croissance. Cela implique que, même dans les systèmes sans limitation de transfert de masse intraparticulaire, comme les cultures agitées, le transfert de masse de la phase solide vers la phase aqueuse peut être limitant. Aussi, ils ont mis en évidence une croissance linéaire de la concentration en biomasse, semblable à la croissance linéaire des bactéries et des levures observée sur les substrats faiblement solubles. Ils ont aussi remarqué que plus le diamètre des particules des cristaux était faible, plus la croissance était rapide, ce qui montre que la surface de cristaux disponible, qui conditionne la dissolution du composé, est essentielle. Caldini et al. (1995) ont également montré l'importance de la forme physique et des dimensions des particules en suspension dans les systèmes aqueux sur les taux de croissance.

Bouchez et al. (1995) ont étudié l'influence des mécanismes de transfert du phénanthrène sur son métabolisme par une souche pure de *Pseudomonas*. Pour cela, ils ont utilisé 2 systèmes d'apport en HAP : des cristaux et de l'huile de silicone. Avec les cristaux, la biodégradation du phénanthrène requérait d'abord le transfert dans la phase aqueuse alors qu'avec l'huile de silicone, les taux de transfert et donc de biodégradation étaient plus élevés, et le phénanthrène était dirigé vers une production de métabolites plus forte et une minéralisation plus faible. Les mêmes auteurs (Bouchez et al., 1996), ayant étudié le métabolisme de 2 souches appartenant aux genres *Rhodococcus* et *Pseudomonas* sur des HAP de différents poids moléculaires, ont mis en évidence des taux de minéralisation élevés (56 à 77% du carbone initial), des productions de biomasse significatives (16 à 35% du carbone initial) et une accumulation limitée mais réelle de métabolites (5 à 23%) fonction du poids moléculaire des HAP : les taux de minéralisation étaient plus forts et les taux de production de biomasse plus faibles pour les HAP les plus lourds.

Enfin, Dingyi et al. (1996) ont étudié la souche de *Pseudomonas paucimobilis* isolée par Mueller et al. (1990). Ayant mis en évidence sa capacité à dégrader par cométabolisme du fluoranthène, mais aussi des HAP tétracycliques et pentacycliques comme le chrysène, le benzo(a)anthracène, le pyrène, le benzo(a)pyrène, le benzo(b)fluoranthène et le dibenzo(a,h)-anthracène, ils ont montré que l'addition de Tween 80 ou de cyclodextrane n'augmentait pas la dégradation du benzo(a)pyrène par cette souche. Or bien qu'on pense généralement que la biodégradation des HAP est limitée par leur hydrosolubilité et leur taux de dissolution, ils en ont conclu que, en plus de l'hydrosolubilité, des facteurs stériques et électroniques contribuent au taux global de dégradation des HAP par les micro-organismes.

De nombreux autres auteurs ont étudié la biodégradation des HAP en milieu liquide ; certains seront cités au III.5.3 qui concerne les voies de dégradation des HAP.

Dans ce qui précède, nous nous sommes appliqués à décrire la biodégradation des HAP par des bactéries, mais d'autres micro-organismes peuvent être impliqués dans ces phénomènes, comme les champignons ou même les algues.

De nombreuses espèces fongiques sont capables d'oxyder le noyau aromatique et il a été démontré que les champignons oxydent les hydrocarbures cancérigènes jusqu'aux mêmes métabolites que ceux formés par le métabolisme des mammifères. Ainsi, ils pourraient servir

de systèmes modèles pour étudier les réactions impliquées dans la cancérogénèse chimique. En outre, les champignons possèdent des capacités métaboliques particulièrement versatiles.

Ainsi, la capacité des Basidiomycètes de la pourriture blanche, en particulier *Phanerochaete chrysosporium*, à dégrader les HAP a été beaucoup étudiée. La dégradation et/ou la minéralisation de nombreux HAP par ce micro-organisme ont été examinées, parmi lesquels le phénanthrène (Bumpus, 1989 ; Hammel and Green, 1991 ; Hammel et al, 1992 ; Sutherland et al., 1993), le fluorène (George and Neufeld, 1989) et les benzofluorènes, l'anthracène (Hammel and Green, 1991), le pyrène (Hammel et al., 1986), le fluoranthène, le benzo(a)anthracène (Hammel et al, 1986 ; Bumpus, 1989) et le benzo(a)pyrène (Bumpus et al., 1985 ; Bogan and Lamar, 1995). L'avantage de *P. chrysosporium* par rapport aux bactéries est qu'à la fois les HAP et les phénols peuvent être complètement éliminés, que la biodégradation a lieu par l'action d'enzymes extracellulaires, ce qui est meilleur pour la biodégradation des HAP de poids moléculaire élevé et les molécules faiblement hydrosolubles. Toutefois, la biodégradation n'est pas complète et des intermédiaires sont détectés (Kennes and Lema, 1994), ce qui pose d'autres problèmes.

Le champignon *Cunninghamella elegans* a également été beaucoup étudié sur le naphthalène, le biphenyle, le phénanthrène (Sutherland et al., 1993), l'anthracène (Cerniglia, 1982 ; Sutherland et al., 1992), le fluoranthène (Pothuluri et al., 1990, 1992), le pyrène (Cerniglia et al., 1986), le benzo(a)anthracène (Cerniglia et al., 1980, 1985) et le benzo(a)pyrène (Cerniglia and Gibson, 1979 ; Cerniglia et al., 1992) car il oxyde ces HAP jusqu'aux métabolites formés chez les mammifères.

Enfin, les algues sont également des micro-organismes importants pour leur capacité à dégrader les HAP. Cerniglia et al. (1980) ont suivi le métabolisme du naphthalène chez 18 cultures algales différentes, parmi lesquelles 5 cyanobactéries, 5 algues vertes, 1 algue rouge, 1 algue brune : ces organismes oxydaient le naphthalène de 0,1 à 2,4%. Warshawsky et al. (1995) ont étudié la biotransformation du benzo(a)pyrène, de l'anthracène et du pyrène par des algues vertes et d'autres espèces sous différentes lumières. Ils ont montré que la dégradation dépend de la quantité d'énergie lumineuse absorbée et émise, de la quantité de HAP à laquelle les algues sont exposées, de la phototoxicité des HAP et de leurs métabolites et des espèces et souches d'algues concernées.

#### III.5.2.2 - Dans les sols

La biodégradation des HAP a été longtemps étudiée en milieu liquide, mais beaucoup moins dans les sols qui sont pourtant l'élément final justifiant des études précédemment décrites. En effet, les phénomènes intervenant sont multiples et donc plus difficilement maîtrisables qu'en milieu liquide. Toutefois, différents chercheurs s'intéressent à ce problème, qui est la suite logique des recherches concernant la dégradation des HAP en milieu liquide, et ce d'autant plus que les résultats obtenus en milieu liquide ne sont pas souvent transposables directement à ce qui se passe dans les sols.

Ainsi, Otte et al. (1994), après obtention de souches bactériennes et fongiques capables de dégrader des HAP et le pentachlorophénol, ont inoculé un sol contaminé avec ces souches et suivi la biodégradation du pyrène et du phénanthrène. Ils ont alors mesuré dans le sol inoculé un taux de minéralisation du phénanthrène et du pyrène égal respectivement à 30 et 80 fois celui mesuré dans le sol natif.

De la même manière, Grosser et al. (1991) avaient déjà observé un fort accroissement de la minéralisation des hydrocarbures aromatiques après réintroduction de différentes souches sélectionnées par enrichissement dans des sols pollués. Alors que les niveaux de minéralisation dus à la microflore indigène étaient de 10 à 48% pour le pyrène, d'indétectable à 46% pour le carbazole et d'indétectable à 25% pour le benzo(a)pyrène dans 3 sols pollués différents après des incubations à long terme supérieures à 180 jours, la minéralisation atteignait 55% du pyrène en 2 jours pour la souche dégradant le pyrène et 45% du carbazole pour la souche sélectionnée sur carbazole.

Des observations similaires ont été réalisées plus tard pour une *Mycobacterium* sp. capable de dégrader le phénanthrène, l'antracène et le pyrène (Grosser et al., 1995). Toutefois, l'inoculation de sols avec cette souche sélectionnée n'avait pas toujours le même effet sur la biodégradation de ces 3 HAP : quand la population naturelle du sol montrait une forte activité de dégradation envers l'un (au moins) de ces HAP, l'addition de cette *Mycobacterium* sp. n'améliorait pas ou peu les taux de dégradation.

Thibault et al. (1996) ont également étudié la biodégradation du pyrène dans 2 sols réels après homogénéisation et tamisage.

Gray et al. en 1994 ont étudié la dégradation d'antracène dans un sol modèle par une culture bactérienne mixte issue d'un sol contaminé par des créosotes. Quelle que soit la concentration initiale en anthracène, la dégradation s'arrêtait à 30 µg/g alors que 1 µg/g est souhaitable pour satisfaire aux spécifications d'un sol propre. La culture produisait des composés solubles capables d'augmenter la solubilité de l'antracène en solution aqueuse, cette solubilité limitant la cinétique de biodégradation. Dans ce cas, les composants du sol, de faible teneur en carbone organique, n'avaient pas d'influence sur la croissance bactérienne ni sur la dégradation, alors que Weissenfels et al. (1992) ont observé une forte diminution de la dégradation bactérienne, ainsi que de la toxicité des HAP dans un sol à forte teneur en carbone organique. En effet, Means et al. (1980) ont montré que l'adsorption des HAP sur des sols humides était seulement corrélée à la teneur en carbone organique, non à la teneur en argile ou en autres constituants minéraux.

L'utilisation de champignons de la pourriture blanche a été également beaucoup étudiée dans les sols à cause du mécanisme d'action extracellulaire des enzymes fongiques qui sont donc censées accéder plus facilement aux polluants dans les sols que les bactéries. Ainsi, la minéralisation du phénanthrène comme HAP modèle dans un sol réel contaminé par des huiles de goudron a été étudiée par Brodkorb and Legge (1992). Dans le sol contenant la seule microflore native, il y avait une minéralisation de l'ordre de 20% en 21 jours contre 38% en 21 jours dans le même sol supplémenté avec *Phanerochaete chrysosporium* par une action synergique.

De même, Andersson and Henrysson (1996) ont étudié la dégradation d'antracène, benzo(a)anthracène et dibenzo(a,h)anthracène dans un sol par différentes souches fongiques (*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *P. chrysosporium*). Ils ont ainsi montré que les profils de dégradation des champignons pouvaient être complètement différents dans un sol hétérogène par rapport à ceux observés en milieu liquide, et mis en évidence différentes capacités de dégradation des HAP par les champignons.

Le principe du compostage a également été étudié pour la dégradation des HAP. Ainsi, Civilini en 1994 a suivi le devenir de 13 des composants les plus importants de la créosote sur

une période de compostage de 15 jours. Pour 4 HAP sur 13, une dégradation supérieure à 99% était mesurée, et une dégradation supérieure à 81% était observée dans tous les cas. Mais les cinétiques de dégradation différaient selon les HAP. Par exemple, le naphthalène était éliminé à plus de 93% en 5 jours, contre 76% pour le phénanthrène dont la dégradation était de 19% supplémentaires entre 5 et 10 jours, alors que pour l'anthracène, le pyrène, le fluoranthène les dégradations observées entre 0 et 5 jours et 5 et 10 jours étaient comparables, et que pour le benzo(a)anthracène et le chrysène les dégradations étaient égales entre 0 et 5 jours, 5 et 10 jours et 10 et 15 jours. Le système était donc capable d'éliminer des quantités substantielles de HAP de fort poids moléculaire en 15 jours.

Wischmann et al. (1996) ont étudié la dégradation de 4 HAP, le fluoranthène, le benzo(a)anthracène, le fluorène et le phénanthrène dans du sol additionné de compost. En 8 semaines, 3% du phénanthrène initial seulement subsistaient et en 11 semaines 33% du fluorène initial, alors que les concentrations en fluoranthène et benzo(a)anthracène avaient diminué de manière insignifiante. Ils ont aussi montré que les phénomènes biotiques de dégradation étaient majoritaires.

Enfin, les activités microbiennes sont liées à la structure de la porosité du sol. Ainsi, Xu et al. (1995) ont montré que l'agrégation améliorait l'environnement physique des micro-organismes et augmentait la biodégradation des hydrocarbures dans les sols.

### III.5.3 - Voies de dégradation des HAP par les micro-organismes

#### III.5.3.1 - Métabolisme des HAP en *cis*-dihydrodiols, phénols et produits à cycle fissuré par des bactéries et des algues vertes

Chez la plupart des bactéries et quelques algues vertes, le principal mécanisme du métabolisme aérobie des HAP implique l'oxydation des noyaux aromatiques par des dioxygénases pour former des *cis*-dihydrodiols (Cerniglia, 1992). Ces dihydrodiols sont ensuite transformés en diphénols, qui sont clivés par d'autres dioxygénases. Les sites initiaux d'attaque enzymatique ont été déterminés pour plusieurs HAP (Figure III.5.3.1-a).

Le métabolisme du naphthalène a été étudié de manière plus extensive que celui de n'importe quel autre HAP. *Pseudomonas* spp. métabolise successivement le naphthalène en naphthalène *cis*-1,2-dihydrodiol, 1,2-dihydroxynaphthalène, acide 2-hydroxychromène-2-carboxylique, acide *trans*-*o*-hydroxybenzylidène-pyruvique, salicylaldéhyde, acide salicylique, et soit du catéchol, soit de l'acide gentisique (Figure III.5.3.1-b).

*Mycobacterium* sp. convertit le naphthalène initialement en naphthalène *cis*-1,2-dihydrodiol, puis en salicylate et catéchol, bien qu'il puisse aussi former un *trans*-dihydrodiol (Heitkamp et al., 1988a). *Rhodococcus* sp. métabolise le naphthalène via l'aldéhyde salicylique, le salicylate et le gentisate (Walter et al., 1991 ; Grund et al., 1992).

L'acénaphtène est catabolisé par une *Pseudomonas* sp., qui l'utilise comme seule source de carbone, via le 1-acénaphtérol et la 1-acénaphténone (Komatsu et al., 1993). *Alcaligenes eutrophus* et *A. paradoxus* utilisent l'acénaphtène comme seule source de carbone en le métabolisant via l'acide 7,8-diketona-phtyl-1-acétique, l'acide 1,8-naphthalène-dicarboxylique et l'acide 3-hydroxyphthalique (Selifonov et al., 1993b).



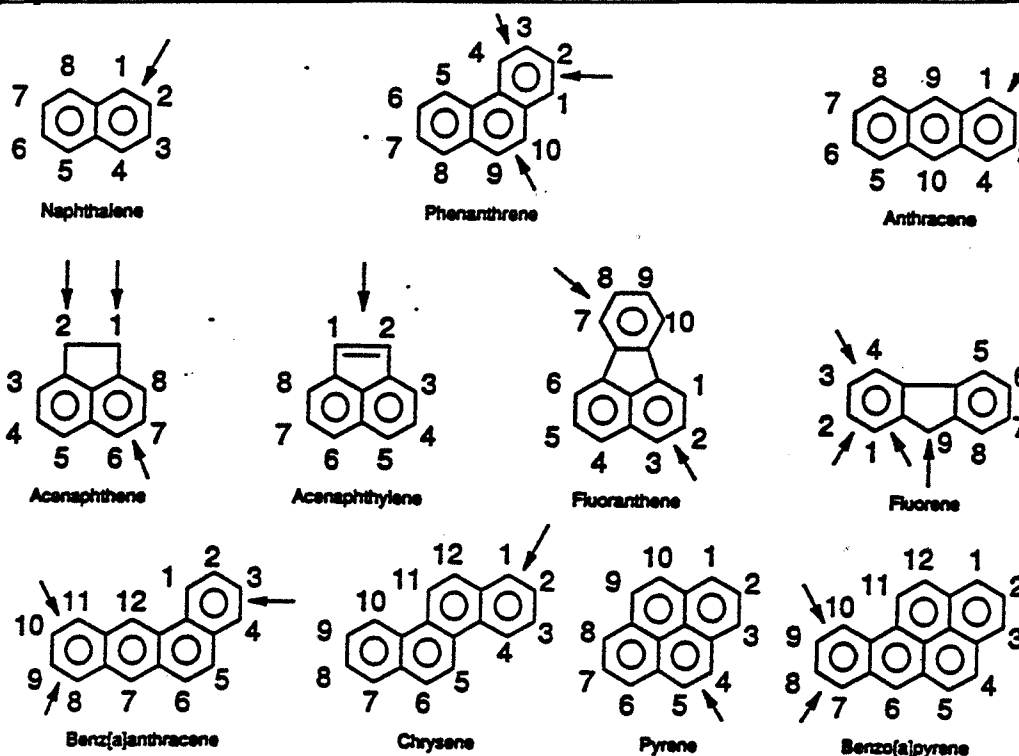


Figure III.5.3.1-a : Sites prédominants d'attaque enzymatique dans l'oxydation microbienne des HAP. Les flèches indiquent les sites primaires du métabolisme. Le benzo(a)pyrène, le benzo(a)anthracène et le chrysène sont des produits cancérigènes biologiquement actifs.

L'acénaphthylène est catabolisé par une *Pseudomonas* sp., qui l'utilise comme seule source de carbone, via l'acide 1,8-naphtalenedicarboxylique (Komatsu et al., 1993).

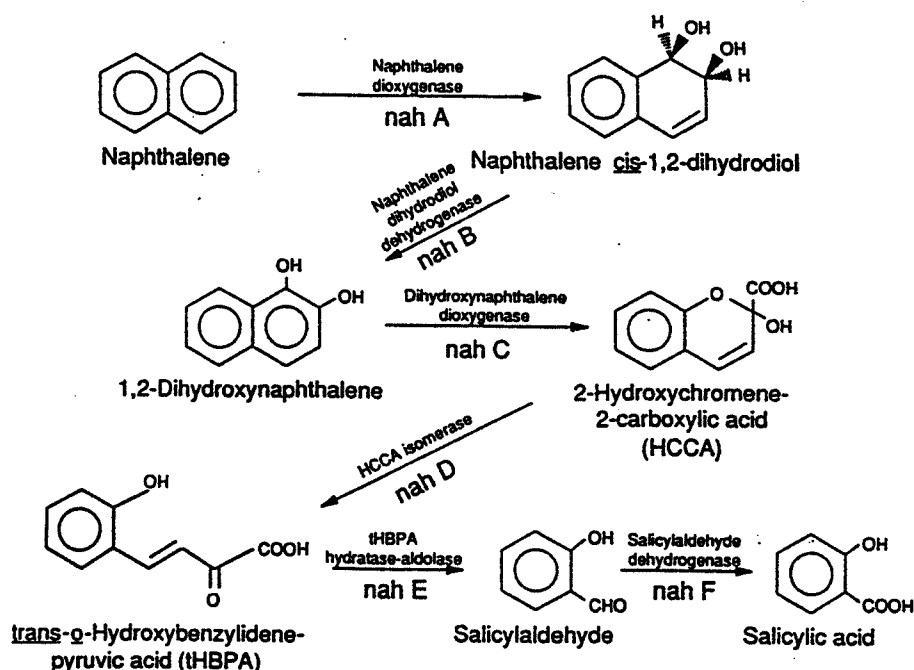


Figure III.5.3.1-b : Stades initiaux du métabolisme du naphthalène en acide salicylique par *Pseudomonas putida* (Eaton and Chapman, 1992). Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme du naphthalène sont désignés par nah.

Alors que *Pseudomonas vesicularis* minéralise le fluorène par une voie inconnue (Weissenfels et al., 1990), une autre *Pseudomonas* sp. métabolise le fluorène en 9-fluorénone, puis par une dioxygénation inhabituelle du carbone angulaire en un autre intermédiaire, la

1,1a-dihydroxy-1-hydrofluorène-9-one (Selifonov et al., 1993a). Des *Rhodococcus* sp. et *Mycobacterium* sp. métabolisent également le fluorène : les métabolites produits par cette dernière incluent le 9-fluorénol, la 9-fluorénone et la 1-indanone (Walter et al., 1991; Boldrin et al., 1993). Une *Arthrobacter* sp. métabolise le fluorène par 2 voies différentes : l'une implique la monooxygénation du C-9, menant au 9-fluorénol et à la 9-fluorénone, l'autre implique une dioxygénation et un clivage méta pour former la 3,4-dihydrocoumarine comme intermédiaire (Grifoll et al., 1992). De manière similaire, *Staphylococcus auriculans* métabolise le fluorène en 9-fluorénol et 9-fluorénone, mais oxyde le dernier produit en 4- et 1-hydroxy-9-fluorénone (Monna et al., 1993).

L'anthracène est métabolisé par une *Pseudomonas aeruginosa* via l'anthracène *cis*-1,2-dihydrodiol, le 1,2-dihydroxyanthracène, l'acide *cis*-4-(2'-hydroxynapht-3-yl)-2-oxobut-3-énoïque, le 2-hydroxy-3-naphtaldéhyde et l'acide 2-hydroxy-3-naphtoïque (Evans et al., 1965). Le dernier composé est minéralisé via l'acide salicylique et le catéchol (Figure III.5.3.1-c). Une *Rhodococcus* sp. utilise également l'anthracène pour sa croissance mais le métabolisme est inconnu (Walter et al., 1991).

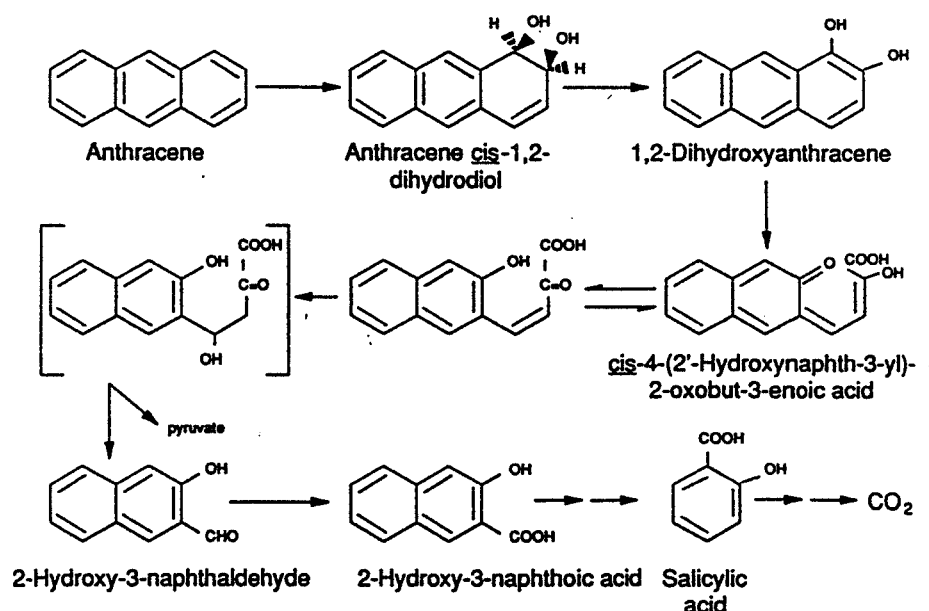


Figure III.5.3.1-c : Voie du métabolisme bactérien de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* (Evans et al., 1965).

Une *Pseudomonas* sp. métabolise le phénanthrène via le phénanthrène *cis*-3,4-dihydrodiol, le 3,4-dihydroxyphénanthrène, l'acide *cis*-4-(1-hydroxynapht-2-yl)-2-oxobut-3-énoïque, le 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde, l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque et le 1,2-dihydroxynaphtalène (Figure III.5.3.1-d). *Pseudomonas paucimobilis* et *Ps. fluorescens* minéralisent toutes deux le phénanthrène (Weissenfels et al., 1990). Une *Aeromonas* sp. métabolise le phénanthrène en 1-hydroxy-2-naphtaldéhyde, 2-carboxybenzaldéhyde, acide *o*-phtalique, acide protocatéchuïque (Kiyohara et al., 1976). Une *Mycobacterium* spp. minéralise le phénanthrène via l'acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, l'acide *o*-phtalique et l'acide protocatéchuïque (Heitkamp et al., 1988a ; Boldrin et al., 1993). Une *Rhodococcus* sp. peut utiliser le phénanthrène pour croître (Walter et al., 1991).

*Pseudomonas paucimobilis* et *Alcaligenes denitrificans* utilisent le fluoranthène pour croître. Les intermédiaires métaboliques produits par *Alcaligenes denitrificans* incluent la 7-acénaphthénone, le 7-hydroxyacénaphtylène et la 3-hydroxyméthyl-4,5-benzocoumarine (Mueller et al., 1990 ; Weissenfels et al., 1990, 1991). Des *Mycobacterium* spp. produisent du CO<sub>2</sub> à partir du fluoranthène, mais n'utilisent pas ce HAP comme seule source de carbone (Heitkamp et al., 1988a; Boldrin et al., 1993). Une *Rhodococcus* sp. peut utiliser le fluoranthène comme seule source de carbone (Walter et al., 1991)

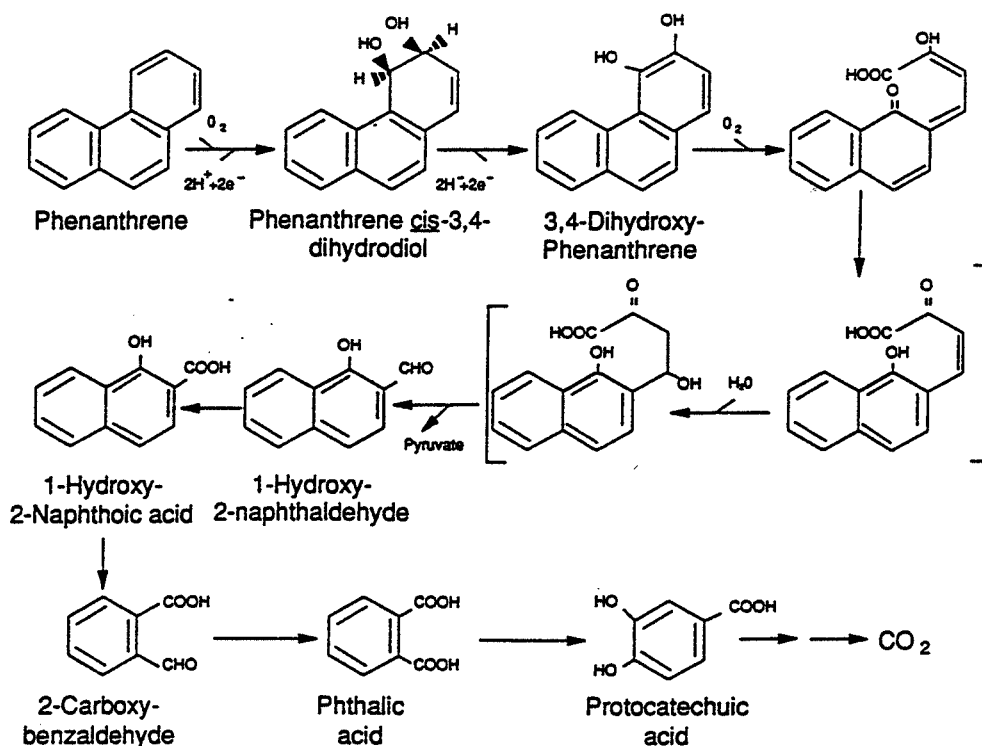


Figure III.5.3.1-d : Voie du métabolisme bactérien du phénanthrène (Evans et al., 1965 ; Kiyohara et al., 1976).

Le pyrène est catabolisé par une *Mycobacterium* spp. pour produire du CO<sub>2</sub> ; les intermédiaires incluent le pyrène *cis*-4,5-dihydrodiol, la 4-hydroxypérinaphténone, l'acide 4-phénanthroïque, l'acide phtalique, l'acide cinnamique, mais aussi un *trans*-dihydrodiol (Heitkamp et al., 1988a, 1988b ; Boldrin et al., 1993). Différentes voies ont été proposées (Figure III.5.3.1-e). *Rhodococcus* sp. produit des métabolites du pyrène différents, parmi lesquels les 1,2- et 4,5-dihydroxypyrene, l'acide *cis*-2-hydroxy-3-(périnaphténone-9-yl)propénique, et l'acide 2-hydroxy-2-(phénanthrène-5-one-4-enyl)acétique (Walter et al., 1991).

Une *Beijerinckia* sp. oxyde le benzo(a)anthracène en *cis*-1,2-, *cis*-8,9- et *cis*-10,11-dihydrodiols (Gibson and Subramanian, 1984). Le métabolisme suivant mène à l'acide 1-hydroxy-2-anthranique, l'acide 2-hydroxy-3-phénanthroïque, l'acide 3-hydroxy-2-phénanthroïque et le CO<sub>2</sub> (Mahaffey et al., 1988).

Walter et al. (1991) ont mis en évidence une *Rhodococcus* sp. capable d'utiliser le chrysène comme source de carbone, mais les voies et les produits de dégradation sont inconnus.

*Beijerinckia* sp. oxyde le benzo(a)pyrène en les *cis*-7,8- et *cis*-9,10-dihydrodiols (Gibson et al., 1975). L'algue verte *Selenastrum capricornutum* produit les benzo(a)pyrène *cis*-4,5-, *cis*-7,8- et *cis*-11,12-dihydrodiols (Warshawsky et al., 1988). Le benzo(a)pyrène est aussi métabolisé par une *Pseudomonas* spp., mais les produits sont inconnus (Barnsley, 1975).

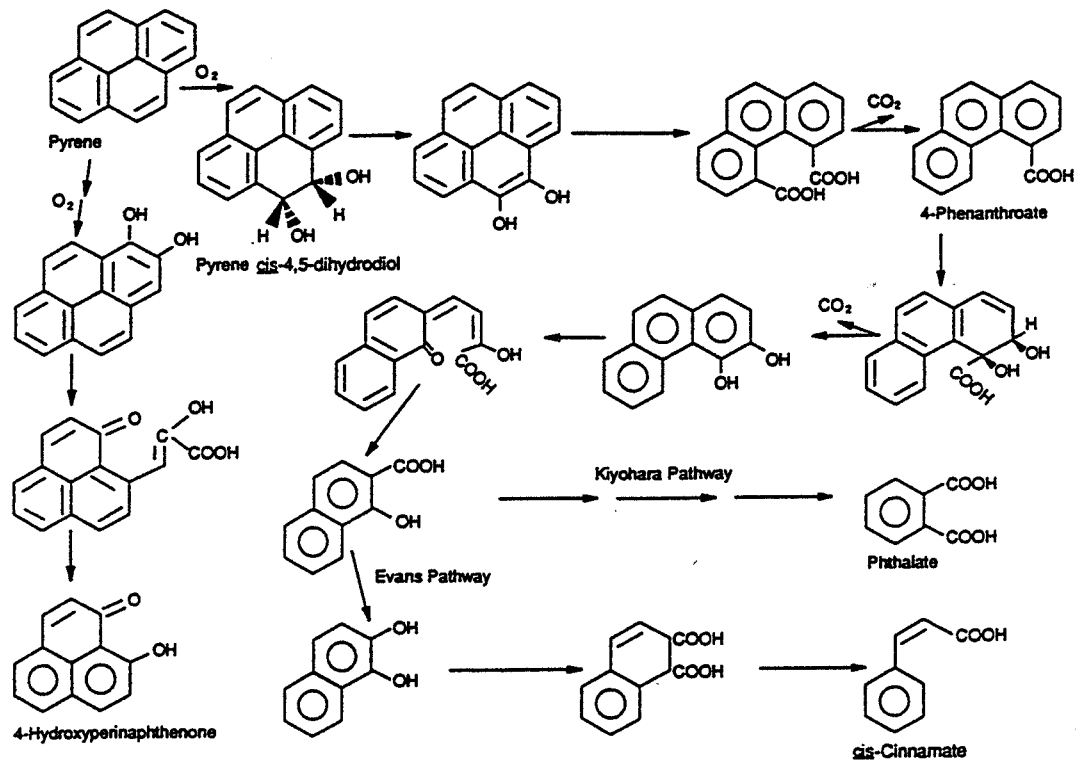


Figure III.5.3.1-e : Métabolisme du pyrène par *Mycobacterium* sp. PYR-1 (Cerniglia, 1992).

### III.5.3.2 - Métabolisme des HAP en *trans*-dihydrodiols par des champignons, des bactéries et des cyanobactéries

De nombreuses espèces de champignons, quelques bactéries et quelques cyanobactéries produisent des monooxygénases du cytochrome P450. Ces enzymes transforment les HAP en oxydes d'arènes, qui sont ensuite soit hydratés pour former des *trans*-dihydrodiols, soit réarrangés de manière non-enzymatique pour former des phénols. Les micro-organismes qui ne possèdent que ces voies de dégradation ne peuvent pas utiliser les HAP comme source de carbone, mais peuvent être capables de les détoxifier (Cerniglia et al., 1992).

Le naphthalène est métabolisé par de nombreux champignons en naphthalène *trans*-1,2-dihydrodiol, 1- et 2-naphtol, 4-hydroxy-1-tétralone (Cerniglia et al., 1978 ; Hofmann, 1986). Des bactéries Gram-positives, comme *Bacillus cereus*, *Streptomyces griseus*, et *Mycobacterium* sp., métabolisent le naphthalène en 1-naphtol (Cerniglia et al., 1984 ; Trower et al., 1988 ; Kelley et al., 1990).

L'anthracène est métabolisé par *Cunninghamella elegans* (Cerniglia, 1982) et *Rhizoctonia solani* (Sutherland et al., 1992) en anthracène *trans*-1,2-dihydrodiol. Il est ensuite

conjugué par *Cunninghamella elegans* pour former du 1-anthryl-sulfate (Cerniglia, 1982) et par *Rhizoctonia solani* en 3 conjugués xylosides différents (Sutherland et al., 1992).

*Cunninghamella elegans* métabolise le phénanthrène en phénanthrène *trans*-1,2-, *trans*-3,4- et *trans*-9,10-dihydrodiols et un conjugué glucoside (Sutherland et al., 1993). *Syncephalastrum racemosum* produit également les *trans*-3,4- et *trans*-9,10-dihydrodiols. Le champignon de la pourriture blanche *Phanerochaete chrysosporium* métabolise le phénanthrène en *trans*-3,4- et *trans*-9,10-dihydrodiols, en 3-, 4- et 9-phénanthrénols et un conjugué glucoside (Sutherland et al., 1993).

Une *Mycobacterium* sp. produit sans doute le *trans*-3,4-dihydrodiol (Boldrin et al., 1993).

Le fluoranthène est métabolisé par *Cunninghamella elegans* en fluoranthène *trans*-2,3-dihydrodiol, 8- et 9-hydroxyfluoranthène *trans*-2,3-dihydrodiols et deux conjugués glucosides (Pothuluri et al., 1990, 1992). *Penicillium* sp., *Laetiporus sulphureus* et d'autres champignons métabolisent également le fluoranthène, mais les produits de dégradation sont inconnus (Sack and Günther, 1993).

*Cunninghamella elegans* métabolise le pyrène en 1-hydroxypyrene, 1,6- et 1,8-pyrènequinones, et trois conjugués glucosides (Cerniglia et al., 1986). *Penicillium* sp. et d'autres champignons métabolisent le pyrène en des produits inconnus (Sack and Günther, 1993). *Mycobacterium* sp. produit du pyrène *trans*-4,5-dihydrodiol et un pyrénol comme intermédiaires en plus des *cis*-dihydrodiols et des autres produits mentionnés ci-dessus (Heitkamp et al., 1988b).

Le benzo(a)anthracène est métabolisé par *Cunninghamella elegans* en les *trans*-3,4-, *trans*-8,9- et *trans*-10,11-dihydrodiols et plusieurs autres dérivés et conjugués (Cerniglia et al., 1980, 1985). Les levures *Candida krusei* et *Rhodorotula minuta* métabolisent le benzo(a)anthracène en produits inconnus (MacGillivray and Shiaris, 1993).

Plusieurs métabolites sont produits à partir du benzo(a)pyrène par *Cunninghamella elegans*, dont les *trans*-7,8- et *trans*-9,10-dihydrodiols, 3- et 9-hydroxybenzo(a)pyrènes, deux quinones, des conjugués variés et des traces du dérivé hautement cancérigène benzo(a)pyrène(+)-7,8-diol-9,10-époxyde-2 (Cerniglia and Gibson, 1979 ; Cerniglia et al., 1992).

### III.5.3.3 - Métabolisme des HAP en quinones par des champignons de la pourriture blanche

Quelques champignons de la pourriture blanche, qui dégradent la lignine et la cellulose du bois, métabolisent les HAP en quinones et autres métabolites par des mécanismes qui ne semblent pas impliquer les *cis*- ou *trans*-dihydrodiols. Dans certains cas, mais pas tous, les lignine-peroxydases sont impliquées.

*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* métabolisent le fluorène en des produits inconnus (George and Neufeld, 1989 ; Sack and Günther, 1993).

L'anthracène est métabolisé par *Phanerochaete chrysosporium*, via la 9-10-anthraquinone et l'acide phtalique, en CO<sub>2</sub> (Hammel and Green, 1991). *Bjerkandera* sp. et quelques autres champignons de la pourriture blanche métabolisent l'anthracène en 9,10-

anthraquinone, alors que *Trametes versicolor* le métabolise sans accumulation d'anthraquinone (Field et al., 1992 ; Sack and Günther, 1993).

Bien que le phénanthrène ne soit pas un substrat de la lignine-péroxydase H8 de *Phanerochaete chrysosporium* (Hammel et al., 1986), il est néanmoins métabolisé par *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* en CO<sub>2</sub> (Bumpus, 1989 ; Sack and Günther, 1993) aussi bien qu'en les *trans*-dihydrodiols, phénols et conjugués signalés précédemment (Hammel and Green, 1991). Les métabolites intermédiaires dans la voie catabolique de *Phanerochaete chrysosporium* incluent la phénanthrène 9,10-quinone et le produit de clivage du noyau, l'acide 2,2'-diphénique (Hammel et al., 1992).

*Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* métabolisent le fluoranthène en produits inconnus (Sack and Günther, 1993).

Le pyrène est oxydé, soit par des cultures de *Phanerochaete chrysosporium*, soit par la lignine-péroxydase purifiée, en pyrène 1,6- et 1,8-quinones (Hammel et al., 1986).

Le benzo(a)anthracène présente des modifications spectrales quand il est incubé avec la lignine-péroxydase et H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : c'est donc un substrat de cette enzyme (Hammel et al., 1986).

*Phanerochaete chrysosporium* métabolise le benzo(a)pyrène jusqu'au CO<sub>2</sub> (Bumpus et al., 1985). *Bjerkandera* sp., *Trametes versicolor*, et *Trametes* sp. métabolisent le benzo(a)pyrène en produits inconnus (Field et al., 1992).

#### III.5.3.4 - Métabolisme des HAP par des bactéries anaérobies

Le potentiel du métabolisme anaérobie des HAP est peu connu. Bien que le naphthalène et l'acénaphthène soient éliminés jusqu'à des niveaux indétectables par des cultures mixtes de bactéries dénitrifiantes (Mihelcic and Luthy, 1988), les voies métaboliques utilisées sont inconnues.

#### **III.5.4 - Evaluation de la toxicité des HAP et de leurs produits de dégradation**

De plus en plus de chercheurs intègrent des tests de toxicité à leurs études de dégradation. Ces évaluations sont importantes non seulement parce qu'une association intime des HAP avec la matrice du sol peut les rendre plus ou moins disponibles, et donc plus ou moins toxiques potentiellement, mais aussi parce que les métabolites peuvent être plus toxiques que les composés parents (Shuttleworth and Cerniglia, 1995). Or, alors que de nombreuses bactéries, cyanobactéries, champignons et algues sont capables de métaboliser les HAP à différents degrés (Cerniglia 1992 ; Cerniglia et al., 1980, 1984, 1992), les rapports sur la formation de produits de dégradation toxiques ou génotoxiques sont rares. Pourtant, des métabolites fongiques sont connus pour être mutagènes, cancérogènes et de toxicité aiguë (Cerniglia et al., 1984). Un autre exemple est l'activation de produits chimiques promutagènes par le système du cytochrome P450 de *Streptomyces griseus* (Sariaslani and Stahl, 1990 ; Sariaslani and Omer, 1992). Toutefois, les données concernant les mélanges de HAP et les populations bactériennes manquent (Cerniglia, 1992).

Belkin et al. (1994) ont étudié la biodégradation de HAP dans des colonnes percolantes sur des sols artificiellement pollués par des mélanges de HAP ou un sol contaminé réel. Dans tous les cas, l'élimination des contaminants originaux était accompagnée d'une augmentation de l'activité génotoxique des effluents par mesure avec le test Mutatox, mais les

comparaisons avec les essais de toxicité (Microtox) ne mettaient pas de corrélation en évidence. Il n'était en outre pas sûr que l'augmentation de génotoxicité soit due aux produits de dégradation des HAP plutôt qu'à des composés présents dans le sol et activés ou relargués pendant le processus.

Ainsi, quand la biodégradation est incomplète, il existe effectivement un potentiel d'observer une augmentation de la toxicité et/ou de la génotoxicité, mais les essais à court terme comme le Microtox ne sont pas toujours adaptés (Belkin et al., 1994).

Baud-Grasset et al. (1993) ont utilisé quant à eux des tests de phytotoxicité pour évaluer la rémédiation fongique de HAP dans un sol contaminé réel. Pour cela, ils ont choisi des plantes supérieures (laitue, avoine et mil) et mesuré la germination des graines ainsi que l'élongation des racines en utilisant des éluats de sol. Ces plantes supérieures sont selon eux plus aptes à mesurer une réduction de la toxicité globale du sol, car la toxicité de mélanges de produits chimiques est difficile à évaluer par analyse chimique. Leurs tests de phytotoxicité ont mis en évidence une bonne corrélation entre la détoxification du sol et la diminution de la teneur en HAP.

### III.5.5 - Effet de l'addition de surfactants sur la biodégradation des HAP

Les surfactants sont des composés amphiphiles capables de diminuer les tensions surfaciques et interfaciales. L'addition de surfactants augmente la concentration des composés hydrophobes dans la phase aqueuse par solubilisation ou émulsification (en augmentant la surface de contact des composés hydrophobes) : des agrégats colloïdaux (micelles) se forment à la concentration de micelle critique (CMC) du surfactant, provoquant une solubilisation accrue ou l'émulsification du composé hydrophobe présent.

Augmenter la concentration d'un composé dans la phase aqueuse favorise sa disponibilité à une attaque microbienne ou l'élimination par d'autres traitements. Il est possible de séparer les surfactants en deux classes : les surfactants synthétiques et les biosurfactants qui sont produits par des micro-organismes. Les biosurfactants peuvent être dégradés par des micro-organismes (Zajic et al., 1977 ; Morgan and Watkinson, 1989), contrairement à certains surfactants chimiques, et peuvent être moins toxiques que les surfactants synthétiques.

Des chercheurs ont observé l'inhibition de la dégradation des HAP en présence de surfactants non ioniques en dessus de leur CMC (Laha and Luthy, 1991 ; Aronstein and Alexander, 1993 ; Tiehm, 1994).

D'autres ont observé que la biodégradation de certains composés organiques peut être améliorée par l'addition de surfactants non ioniques à des concentrations en deçà de leur CMC (Aronstein and Alexander, 1993) ou en présence de micelles de surfactant (Bury and Miller, 1993).

Ainsi, Thibault et al. (1996) ont étudié l'effet de l'addition de quatre surfactants sur la dégradation, par des *Pseudomonas* isolées par enrichissement d'un sol contaminé, du pyrène adsorbé dans des sols. Ils ont montré que l'inoculation de bactéries dégradant le pyrène en présence d'un surfactant peut augmenter la minéralisation en conditions insaturées, mais en conditions saturées, la biodégradation était plus efficace en l'absence de surfactant.

Tsomides et al. (1995) ont étudié la capacité de sept surfactants non ioniques commerciaux appartenant à trois classes de surfactants différentes d'améliorer la

bioremédiation de sols contaminés par des HAP. Parmi les sept surfactants testés, seul le Triton X-100 n'inhibait pas la minéralisation du phénanthrène à des concentrations supérieures à la CMC : l'addition de surfactant ne semblait donc pas augmenter la biotransformation ou la minéralisation du phénanthrène.

En effet, les surfactants sont connus pour leur capacité à solubiliser les enzymes cellulaires, les récepteurs et les protéines (Swisher, 1987). Une interruption des événements cellulaires médiés par la membrane ou une destruction de l'intégrité de la membrane sont des explications probables pour l'inhibition de la minéralisation du phénanthrène par les surfactants non ioniques.

Churchill et al. (1995) ont étudié l'effet de 3 surfactants non ioniques, le Triton X-45, le Triton X-100 et le Triton X-165, sur le taux de biodégradation du phénanthrène par des cultures bactériennes pures. Selon les bactéries utilisées, ils augmentaient les taux de biodégradation ou les inhibaient : en plus d'une augmentation de la concentration aqueuse des hydrocarbures, les surfactants interagissent avec les surfaces bactériennes et les variations de résultats sont dues aux différences entre les bactéries utilisées.

Aussi, Tiehm (1994) a étudié la dégradation de HAP en présence de neuf surfactants synthétiques pour mieux comprendre les interactions fondamentales entre les HAP, les surfactants et les bactéries, en se concentrant sur la toxicité des surfactants et la biodisponibilité des HAP solubilisés. Il a alors observé une augmentation de la concentration de HAP en solution aqueuse par solubilisation avec les surfactants non ioniques et le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), alors que la dégradation des HAP était inhibée par le SDS à cause de son utilisation préférentielle comme substrat de croissance. La toxicité des surfactants de type alkyléthoxylate et alkylphénoléthoxylate diminuait quand leur hydrophilie augmentait, c'est-à-dire quand la longueur de la chaîne éthoxylate augmentait. Ainsi, les surfactants non toxiques et non préférés comme substrats de croissance augmentaient la dégradation des fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène.

Putcha and Domach (1993) ont constaté que la présence du surfactant Triton X-100 semblait protéger significativement le naphthalène de la biodégradation en le piégeant dans ses micelles, à moins qu'il n'inhibe la croissance cellulaire. Ghosh et al. (1995) ont également observé que l'addition de Triton X-100, à des concentrations jusqu'à 24 fois sa CMC, n'augmentait pas la biodégradation des HAP dans un sol contaminé.

Les biosurfactants sont une deuxième catégorie de surfactants particuliers étudiés à cause de leurs propriétés de biodégradabilité. Ainsi, les résultats concernant l'utilisation des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures sont variables.

Providenti et al (1995) ont étudié l'effet de l'addition de biosurfactants rhamnolipidiques et d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* (UG2) produisant des rhamnolipides sur la minéralisation du phénanthrène dans des boues de sol. Les effets observés variaient en fonction du sol. Il y avait inhibition de la biodégradation dans les boues de terreau sableux et de terreau limoneux alors qu'il y avait stimulation dans les boues de sol contaminé par la créosote, en particulier en présence de la combinaison de *Pseudomonas aeruginosa* UG2 et d'une souche de *Pseudomonas* sp. dégradant le phénanthrène. Ainsi, des cellules entières étaient plutôt requises, mais les effets observés ne peuvent être catégoriquement attribués aux biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* UG2.



Deschênes et al. (1996) ont étudié l'addition de SDS et des mêmes biosurfactants produits par *Pseudomonas aeruginosa* UG2 sur la biodégradation de HAP dans un sol contaminé par la créosote. Ils ont suivi 13 HAP sur les 16 prioritaires selon l'U.S. E.P.A.. Ainsi, les deux surfactants n'avaient aucun effet sur la biodégradation des HAP de 3 cycles, quelle que soit leur concentration, mais diminuaient significativement, en particulier le SDS, la biodégradation des HAP de 4 cycles. Pour les HAP de plus de 4 cycles, aucune biodégradation n'était observée. D'autres études ont montré une absence de biodégradation détectable des HAP de 5 cycles ou plus sous des conditions similaires (Aprill and Sims, 1990). Il n'y avait pas de toxicité des surfactants, quelle que soit la concentration utilisée.

Oberbremer et al. (1990) ont étudié l'influence de surfactants microbiens (des glycolipides) sur la biodégradation d'hydrocarbures : elle était plus rapide, plus élevée et la biomasse produite était augmentée. Les biosurfactants étaient dégradés après avoir facilité la dégradation de tous les hydrocarbures. Zhang and Miller (1995) ont étudié l'effet de la structure de 2 rhamnolipides sur la solubilisation et la biodégradation de n-alkanes : une forme ester de méthyle et une forme acide. La forme acide était moins efficace, mais un problème majeur est que la méthode d'obtention des dirhamnolipides favorise la forme acide au détriment de la forme ester méthylique.

Enfin, Strong-Gunderson and Palumbo (1995) ont étudié l'addition de Tween 80, un biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9721, à des concentrations inférieures à la CMC : ils ont observé une augmentation de la disponibilité et de la dégradation du naphthalène.

Ainsi, même si l'addition de surfactants semble une approche valable pour augmenter la biodisponibilité et sans doute la biodégradation des contaminants hydrophobes, leur rôle dans les processus de biodégradation n'est pas toujours clair. En outre, des résultats montrent que leur addition n'est pas toujours bénéfique (Laha and Luthy, 1991). En fait, plusieurs facteurs peuvent affecter le processus de biodégradation, comme la possibilité d'une disponibilité plus faible du contaminant dans les micelles (Laha and Luthy, 1991) et la compétition possible entre les surfactants et les contaminants (Tiehm, 1994). Les surfactants eux-mêmes peuvent être toxiques à la microflore du sol (Kuhnt, 1993) ou peuvent être si facilement biodégradés que leur apport n'est pas visible.

**MATERIELS**  
**ET**  
**METHODES**



## CHAPITRE IV : MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le sol réel que nous utiliserons dans la suite des expériences nous a été fourni par ICF Environnement (Gennevilliers) qui l'a prélevé sur un site d'ancienne usine à gaz pollué par des HAP. En juillet 1995, date à laquelle le premier échantillon a été prélevé, une dépollution biologique du site allait être entreprise. Le deuxième échantillon qui nous a été fourni a été prélevé en juin 1996, au cours d'une campagne d'échantillonnage sur le terre biologique en cours de dépollution, campagne réalisée pour suivre l'évolution du processus.

Avant d'entamer chaque série d'expérimentations, une caractérisation en termes de population microbienne et de pollution par les HAP a été réalisée.

Nous présenterons les protocoles expérimentaux de cette partie Matériels et Méthodes dans le même ordre que les parties Résultats et Discussion exposées dans la suite.

### IV.1 - Protocoles de caractérisation du sol et de la pollution

La préparation des échantillons a été la même pour les deux prélèvements (juillet 95 et juin 96), la caractérisation physico-chimique totale n'ayant été menée que sur le premier prélèvement.

#### IV.1.1 - Préparation et stockage de l'échantillon

Les échantillons prélevés sont un mélange de cailloux et de sol. Il est tamisé à 2mm afin d'obtenir des échantillons homogènes qui permettront de comparer les expériences entre elles, et de se placer dans des conditions fréquemment utilisées dans la littérature. La fraction du sol de granulométrie > 2mm, formée de cailloux et graviers, n'est pas la fraction dans laquelle se niche la pollution, et dans les méthodes de mesure de pollution, un tamisage préalable à 2mm est réalisé (méthode EPA 3540 pour la mesure de la teneur en HAP du sol). Après tamisage, la fraction < 2mm est soigneusement homogénéisée. Si elle n'est pas utilisée de suite, elle est stockée à +4°C, à l'obscurité dans un récipient en verre stérile, de façon à limiter les biotransformations et les pertes abiotiques.

L'analyse granulométrique ne prend en compte que la fraction inférieure à 2 mm, appelée sol fin (Bonneau et Souchier, 1994). On distingue les fractions de graviers ( $\varnothing > 2\text{mm}$ ), de sable ( $63\ \mu\text{m} < \varnothing < 2\ \text{mm}$ ), d'argiles et de limons ( $\varnothing < 63\ \mu\text{m}$ ).

#### IV.1.2 - Caractérisation physico-chimique

##### IV.1.2.1 - Humidité

Pour mesurer l'humidité d'un sol, un échantillon humide est pesé dans un creuset en céramique, préalablement séché à 105°C et placé ensuite 1 heure dans un dessiccateur à 20°C. Puis cet échantillon, avec le creuset, est placé dans un four à 105°C pendant 48 heures. Après refroidissement dans le dessiccateur, l'échantillon sec est pesé et l'humidité de l'échantillon initial est calculée comme suit :

$$\% \text{ humidité} = 100 \times (m_2 - m_3) / (m_3 - m_1)$$

où :  $m_1$  = masse du creuset sec (g)  
 $m_2$  = masse de l'échantillon humide et du creuset sec (g)  
 $m_3$  = masse de l'échantillon sec et du creuset sec (g)

#### IV.1.2.2 - Capacité de rétention de l'eau (ou Water Holding Capacity, WHC)

La WHC correspond à l'humidité résiduelle du sol après saturation en eau et drainage libre sous la seule action de la pesanteur en atmosphère saturée en eau. Pour la déterminer, une portion de sol est additionnée à une quantité saturante d'eau (on obtient une boue), l'incubation est réalisée sur la nuit et le mélange est filtré sur papier Whatman n°42. Le pourcentage d'humidité de la portion retenue sur le filtre correspond à la WHC.

#### IV.1.2.3 - Acidité

Hormis les sols neutres et surtout carbonatés, la détermination des pH à l'eau et au KCl est d'intérêt car  $\Delta\text{pH} = (\text{pH à l'eau}) - (\text{pH au KCl})$  révèle l'acidité potentielle ou activité d'échange du sol (Bonneau et Souchier, 1994). Le sol est mis en suspension dans de l'eau milliQ (procédé Millipore) ou du KCl 1M sous agitation avec un barreau magnétique pendant 60 minutes à une température proche de 20°C, et la lecture au pH-mètre est faite après stabilisation.

#### IV.1.2.4 - Sulfates solubles

Les sulfates solubles sont les sulfates extractibles à l'eau. Après extraction, ils sont précipités en milieu chlorhydrique à l'état de sulfate de baryum, le précipité obtenu est stabilisé à l'aide d'une solution de Tween 20, et l'absorbance des suspensions homogènes est mesurée à 650 nm au spectrophotomètre d'absorption UV-visible (Kontron-Uvikon 860C), selon le protocole décrit par Rodier (1971).

#### IV.1.2.5 - Ammoniac et nitrates extractibles au KCl

Le sol est incubé avec du KCl 1M à un rapport (1/100, w/w) et les ions  $\text{NH}_4^+$  extraits (donc en solution) sont dosés après centrifugation du mélange par réaction avec le phénate de sodium (méthode de Harper) en milieu alcalin. Il y a formation d'un composé diazo bleu absorbant à 640 nm (Bonneau et Souchier, 1994).

Les nitrates réagissent avec du salicylate de sodium pour donner du p-nitrosalicylate de sodium qui développe une coloration jaune absorbant à 420 nm (Rodier, 1971).

#### IV.1.2.6 - Phosphore

La méthode dite « Duchaufour et Bonneau » consiste en une première extraction à l'acide sulfurique N/250 (pour le phosphore lié au calcium), suivie d'une extraction à la soude N/10 (pour le phosphore lié à l'aluminium, le fer et les humophosphates). Le dosage colorimétrique à 825 nm est décrit par Bonneau et Souchier (1994).

#### IV.1.2.7 - Granulométrie

La fraction inférieure à 1mm (après tamisage manuel) a été analysée en granulométrie Laser avec un granulomètre Laser Coulter LS 130 en utilisant l'eau comme fluide porteur.

#### IV.1.2.8 - Azote Kjeldahl

L'analyse de la teneur en azote du sol par la méthode Kjeldahl a été réalisée par le Laboratoire Crépin Analyses et Contrôles (Rouen) selon la méthode NF X 31 111. Elle détermine la quantité totale d'azote (N) dans le sol.

#### **IV.1.3 - Caractérisation microbiologique du sol (méthode de dénombrement)**

Une fiole d'Erlenmeyer contenant 100 ml de NaCl 0,9% est stérilisée, puis additionnée de 10 g de milieu naturel tamisé à 2 mm. Après agitation orbitale 1 heure à température ambiante, la boue obtenue est décantée 1 heure et des dilutions décimales sont réalisées avec

le surnageant dans NaCl 0,9%. 100 µl de chaque dilution sont étalés sur les géloses dont la composition est décrite ci-après. On procède au comptage des unités formant colonie (UFC) sur la gélose qui en comprend entre 30 et 300.

#### IV.1.3.1 - Bactéries et Actinomycètes

La gélose utilisée contient (par litre) 15 g de Nutrient Broth (Difco), 15 g d'agar (bioMérieux) et son pH est ajusté à 7-7,5 avant autoclavage 20 mn à 121°C et 1,5 bar.

Les gélosesensemencées sont incubées de 2 à 4 jours à 30°C.

#### IV.1.3.2 - Levures et champignons

La gélose utilisée contient (par litre) 15 g d'Extrait de Malt (bioMérieux), 15 g d'agar (bioMérieux) et son pH est ajusté à 4-5 avant autoclavage 20 mn à 121°C et 1,5 bar.

Les gélosesensemencées sont incubées de 3 à 7 jours à 23°C.

### **IV.1.4 - Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques dans les sols**

#### IV.1.4.1 - Extraction au soxhlet : Méthode EPA 3540

Avant de procéder à l'extraction, il faut éliminer les éléments étrangers (feuilles, pierres), puis déterminer le pourcentage d'humidité du sol à extraire.

Ensuite, 5 g d'échantillon solide sont mélangés à 5 g de sulfate de sodium (Prolabo, Normapur) anhydre et placés dans un cartouche d'extraction (Whatman). 150 ml de solvant d'extraction acétone-hexane (1:1) (Prolabo, Normapur et Rectapur, respectivement) sont placés dans un ballon d'extraction de 250 ml contenant 3 pierres-ponces. Le ballon est fixé à l'extracteur de Soxhlet et l'extraction sous reflux est menée pendant 16 heures.

L'extrait obtenu est ensuite séché sur une colonne séchante en verre de 25 mm de diamètre interne contenant 10 cm de sulfate de sodium anhydre et récolté dans un concentrateur de Kuderna-Danish de 500 ml, avec un tube concentrateur de 10 ml. Le ballon d'extraction et la colonne séchante sont lavés avec 50 ml d'acétone-hexane (1:1) pour assurer le transfert quantitatif d'extrait. Ensuite, le concentrateur est fixé à une colonne de Snyder à 3 étages et le tube concentrateur immergé dans un bain-marie chauffant de façon à ce que la concentration soit réalisée en 20 minutes environ. Quand le volume apparent dans le tube concentrateur atteint 1ml, le bain-marie est enlevé et l'ensemble refroidit environ 15 minutes.

L'extrait concentré ainsi obtenu ne peut pas être directement analysé en CLHP car il contient de nombreuses molécules organiques autres que les HAP (molécules pouvant provenir de la décomposition de végétaux, par exemple) et son injection directe en CLHP provoquerait sans doute un colmatage rapide de la colonne de séparation utilisée, et mènerait également à l'obtention de chromatogrammes extrêmement bruyants. Aussi, une pré-chromatographie est nécessaire pour éliminer ces molécules indésirables.

#### IV.1.4.2 - Passage sur gel de silice : Méthode EPA 3630

Avant le passage sur gel de silice, le solvant d'extraction doit être changé pour du cyclohexane. Pour cela, l'extrait précédemment concentré est additionné de 4 ml de cyclohexane (qualité Normapur, Prolabo) et 1 pierre-ponce, et le tube concentrateur de 10 ml est fixé à une colonne de Snyder à 2 étages. La concentration est réalisée de manière similaire au IV.1.4.1 en 10 minutes et le volume final d'extrait en cyclohexane est ajusté à 2 ml environ.

La colonne est remplie avec la quantité requise d'adsorbant, puis avec un absorbeur d'humidité et enfin chargée avec l'échantillon à analyser. L'élution des analytes est réalisée par un solvant adapté qui laisse les composés interférants sur la colonne. L'éluat est ensuite concentré. La silice utilisée (Sorbsil C60(60-210 $\mu$ m)A, Prolabo) a une granulométrie de 60 à 210  $\mu$ m. Avant utilisation, elle est activée 16 heures à 130°C.

10 g de silice activée dans du dichlorométhane (qualité Chromanorm, Prolabo) sont placés dans une colonne chromatographique en verre de longueur 250 mm et de diamètre interne 10 mm. La silice se dépose pendant que le dichlorométhane est élué, et 2 cm de sulfate de sodium anhydre sont ajoutés en haut de colonne. La colonne ainsi préparée est alors prééluée avec 40 ml de pentane (Chromanorm, Prolabo), et juste avant exposition du sulfate de sodium à l'air, les 2 ml d'extrait en cyclohexane sont transférés, 2 ml de cyclohexane pour rinçage complétant le transfert quantitatif. Juste avant exposition du sulfate de sodium à l'air, 25 ml de pentane sont additionnés, et l'éluat de pentane est éliminé. Ensuite, l'élution est réalisée avec 25 ml d'un mélange dichlorométhane-pentane (2:3) dans un concentrateur de Kuderna-Danish.

Les composés élués dans cette fraction sont : acénaphène, acénaphylène, anthracène, benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(g,h,i)pérylène, benzo(k)-fluoranthène, chrysène, dibenzo(a,h)anthracène, fluoranthène, fluorène, indéno(1,2,3-cd)pyrène, naphthalène, phénanthrène et pyrène.

L'éluat est alors concentré selon les modalités déjà décrites et le solvant du concentrat obtenu est échangé pour de l'acétonitrile par addition de 50 ml d'acétonitrile suivie d'une concentration finale à 5 ml maximum. L'échantillon est alors prêt pour l'analyse en CLHP.

#### IV.1.4.3 - Analyse par Chromatographie Liquide Haute Pression (CLHP)

La mise au point de la méthode d'analyse a été inspirée de la méthode EPA 8310.

La colonne de CLHP utilisée est une colonne Supelcosil LC-PAH (Supelco) de diamètre interne 3,0 mm, de longueur 250 mm, avec des particules de diamètre 3  $\mu$ m. Le module CLHP est constitué d'une pompe à gradient (modèle 616, Waters) couplée au module de contrôle 600S (Waters), et d'un injecteur Rhéodyne manuel. Le détecteur est le détecteur UV-visible à barrette de diodes modèle 996 de Waters. Il fait l'acquisition des spectres d'absorption entre 200 nm et 600 nm. Les solvants utilisés sont de qualité chromatographique.

L'élution est réalisée avec un gradient linéaire acétonitrile (solvant A) - eau milliQ (solvant B) à 0,7ml/mn dans les conditions suivantes :

T= 0 mn	: 50% solvant A – 50% solvant B
T= 5 mn	: 50% solvant A – 50% solvant B
T= 40 mn	: 100% solvant A
T= 50 mn	: 100% solvant A
T= 52 mn	: 50% solvant A – 50% solvant B.

20  $\mu$ l d'extrait dilué au 1/10ème ou au 1/100ème et filtrés sur un filtre Téflon de porosité 0,22  $\mu$ m sont injectés pour les analyses. L'étalonnage a été réalisé en utilisant un standard de chez Supelco (EPA 610 PAH mix, ref. : 48743).

## **IV.2 - Dégradation naturelle des HAP en microcosmes de sol**

Nous avons mesuré la dégradation naturelle des 16 HAP cibles en microcosmes de sol dans les conditions décrites dans la suite.

**IV.2.1 - Dispositif expérimental**

Pour cela, nous disposons de bocaux en verre circulaires (Polylabo) de diamètre 100 mm et de hauteur 125 mm, fermés par un bouchon de diamètre 71 mm en plastique au milieu duquel figurait un trou de 20 mm de diamètre obturé par un bouchon de silicone (de culture, perméable aux gaz) pour permettre les échanges gazeux. Ces bocaux étaient stérilisés par autoclavage (121°C, 1,5 bar, 20 mn) avant addition des échantillons de sol.

Le sol pollué était placé stérilement dans les bocaux de façon à ce que sa densité (à 20% d'humidité) soit de 1 g/cm<sup>3</sup>.

L'humidité était ajustée par pesée et addition d'eau milliQ stérile en cas de besoin.

L'aération du sol était assurée manuellement de manière hebdomadaire.

Les bocaux contenant le sol (microcosmes) étaient incubés de manière statique dans une chambre thermostatée.

La sciure utilisée ici est en fait un résidu de coupe de feuillus, supposé en cours de décomposition, utilisé par ICF Environnement comme additif (texturant) dans le sol constituant le terre biologique en cours de dépollution décrit dans l'introduction de ce chapitre.

Pour la mesure des teneurs en HAP (cf. IV.1.4), des prélèvements en double étaient réalisés. Les deux échantillons ainsi prélevés étaient traités de façon indépendante. Les moyennes et les écarts-types qui figurent dans les résultats sont calculés sur les mesures obtenues sur ces 2 prélèvements.

Parallèlement, un prélèvement était réalisé pour les dénombrements (cf. IV.1.3) des populations microbiennes. Les résultats des dénombrements sont calculés sur deux valeurs.

**IV.2.2 – Première série : 20% d'humidité, pH=7,2, avec ou sans 30% (w/w) de sciure, 23°C**

Les échantillons de sol utilisés ici proviennent du premier échantillonnage de juillet 1995. Le suivi a été fait sur 95 jours environ.

	Sol sec (g)	Sciure (g) prélevée sur le site	% d'humidité du sol	Notation et chapitre
Bocal n°1	408	0	20	Condition 1 au V.2
Bocal n°2	408	144 (30% w/w)	20	Condition 2 au V.2

30% (w/w) : calculé par rapport au sol à 20% d'humidité

Dans cette première série, nous n'avons pas utilisé le dispositif décrit ci-dessus, mais 2 récipients rectangulaires en pyrex de dimensions L= 210 mm, l= 150 mm et H= 50 mm, car nous avons voulu faire un essai avec une quantité de sol plus élevée. La densité du sol était la même que ci-dessus, i.e. 1g/cm<sup>3</sup>.

**IV.2.3 - Deuxième série : 27% d'humidité, pH=7,2 ou 5,3, avec ou sans 30% (w/w) de sciure, 23°C**

Les échantillons de sol utilisés ici proviennent du premier échantillonnage de juillet 1995, après conservation à +4°C dans l'obscurité dans des bocaux en verre. Le suivi a été fait sur 110 jours environ.



	Sol sec (g)	% humidité	Conditions	Notation et chapitre
Bocal n°1	151	27	pH =7,2	Condition 3 au V.2
Bocal n°2	183	27	pH=5,3	Condition 4 au V.2
Bocal n°3	185	27	pH=5,3 et 70 g de sciure	Condition 5 au V.2

#### IV.2.4 – 20% d’humidité, pH=7,2, 23°C ou 30°C.

Les échantillons de sol utilisés ici proviennent du deuxième échantillonnage de juin 1996. Le suivi a été fait sur 95 jours environ.

	Température (°C)	Sol sec (g)	Notation et chapitre
Bocal n°9	30	122,3	30°C au V.3
Bocal n°10	23	124,9	23°C au V.3

### IV.3 - Sélection et étude de micro-organismes dégradant des HAP

#### IV.3.1 - Protocole de sélection et mise en évidence des micro-organismes

##### IV.3.1.1 - Sélection des micro-organismes

A partir d’une suspension de sol réalisée dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%), des milieux de culture contenant le contaminant X (ici fluorène, ou phénanthrène, ou anthracène, ou fluoranthène, ou pyrène), déterminé comme seule source de carbone, sont ensemencés.

Après cette première phase, plusieurs repiquages successifs sont réalisés afin d’éliminer la probabilité de croissance à partir d’éléments nutritifs propres à des cellules physiologiquement mortes, apportées avec l’ensemencement, et d’affirmer la qualité des souches par augmentation régulière de la teneur en contaminants toxiques.

Le milieu de culture choisi (désigné par MSM dans la suite) doit favoriser la sélection des bactéries en tant que micro-organismes dégradant des HAP : en effet, il nous est plus facile de travailler sur des bactéries que sur des champignons.

Sa composition est la suivante (par litre d’eau milliQ) : 680 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 890 mg  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 350 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg  $\text{NO}_3\text{NH}_4$ , 0,005 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,01 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,01 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 mg  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 mg  $\text{FeSO}_4$ . Son pH après autoclavage (20 mn à 121°C sous 1,5 bar) est environ égal à 6,8.

100 µl de solution de HAP (cristaux purs commerciaux) cible solubilisé dans l’acétone à une concentration de 10 mg/ml, soit 1mg de polluant, sont déposés dans des fioles d’Erlenmeyer en verre. L’acétone est évaporé sous hotte aspirante. Puis 25 ml du milieu MSM sont additionnés et l’ensemble est stérilisé par autoclavage : la pseudo-concentration finale est de 40 mg/l de HAP dans chaque fiole d’Erlenmeyer (elle est supérieure aux solubilités aqueuses de tous les HAP utilisés). Du sol pollué est ensuite additionné aux concentrations finales de 0,1 et 0,01 g/l.

5 étapes successives, décrites ci-après, sont considérées suffisantes pour la sélection des micro-organismes, la totalité du processus ayant duré environ 4 mois.

Etape 1 : incubation 20 jours à 23°C, sous agitation orbitale à 110 tours/mn.

Étapes 2, 3, 4 et 5 : repiquages successifs en milieu liquide avec des teneurs croissantes en polluant. Lesensemencements sont réalisés à partir de la culture de l'étape précédente. L'étape 1 est renouvelée après chaque repiquage.

La sélection a été faite en utilisant de faibles quantités de HAP dans le milieu, car si la quantité est trop élevée, alors des micro-organismes qui ne dégradent les HAP que lorsque la concentration en polluant est élevée peuvent être favorisés, ce qui n'est pas intéressant pour atteindre des faibles teneurs en fin de dégradation.

Les HAP purs utilisés sont l'acénaphthène (99%, Janssen), le fluorène (98%, Acros), le phénanthrène (98%, Acros), l'anthracène (97%, Aldrich), le fluoranthène (98%, Aldrich) et le pyrène (96%, Janssen).

#### IV.3.1.2 - Mise en évidence des micro-organismes

Pour la mise en évidence de la sélection, nous avons donc augmenté la quantité de HAP (seule source de carbone dans le milieu) présente par addition de cristaux de HAP visibles à l'œil nu dans la proportion de 1mg/ml de milieu liquide, soit 25 fois plus que dans l'étape de sélection.

Nous avons ensuite suivi la turbidité du milieu de culture, révélatrice de la croissance microbienne, par la mesure de l'absorbance à 600 nm (ou Abs<sub>600nm</sub>) de ce milieu (la référence étant le surnageant après centrifugation) en fonction du temps de mise en culture, avec un spectrophotomètre d'absorption UV-visible (Kontron-Uvikon 860C). Des contrôles de croissance ont été également réalisés : milieu MSM avec source carbonée non inoculé, milieu MSM inoculé sans source carbonée.

La température était de 23°C, l'agitation orbitale de 110 tours/mn.

Cinq consortia de micro-organismes ont ainsi été obtenus, qui seront dans la suite désignés par FT pour le consortium sélectionné sur le fluoranthène, PT sur le phénanthrène, PY sur le pyrène, AT sur l'anthracène et FN sur le fluorène.

### **IV.3.2 - Etude de la croissance sur différentes sources carbonées**

Après leur sélection, chacun des consortia a été étudié pour sa capacité à utiliser d'autres sources carbonées que le HAP de sélection. Les essais ont été réalisés en double.

#### IV.3.2.1 – Conditions de culture

Ainsi, ils ont tous été mis en présence, de manière individuelle, avec le fluoranthène, le phénanthrène, l'anthracène, le pyrène, le fluorène, à 1mg/ml dans du MSM, dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 150 ml de milieu sous agitation orbitale à 110 tours/mn et 23°C.

Après ce premier contact avec d'autres HAP, chaque consortium a été repiqué sur la nouvelle source étudiée pour une deuxième exposition dans les mêmes conditions de culture. FT exposé une fois au phénanthrène (1<sup>ère</sup> exposition) a été repiqué sur le phénanthrène (2<sup>ème</sup> exposition), FT exposé une fois au pyrène a été à nouveau repiqué sur le pyrène, etc... ,de la même façon pour les autres combinaisons où une croissance (ou une autre modification) a été observée lors de la première exposition.

Nous procédons toujours parallèlement aux repiquages des 4 consortia sur leur HAP de sélection.

Ensuite, la croissance des 4 consortia FT, PT, PY et AT sur leur HAP de sélection a été étudiée en présence d'un biosurfactant, le Tween 80 (Sigma), aux concentrations de 0,01% et 0,03%, où 0,03% est égal à la C.M.C (concentration de micelle critique) d'après Strong-Gunderson and Palumbo (1995), la quantité initiale de HAP étant de 1 mg/ml de MSM.

Enfin, la croissance des consortia sur leur HAP de sélection a été étudiée avec des concentrations initiales de HAP de 1 ; 2 ; 5 et 10 mg/ml de MSM.

Des témoins de spécificité de croissance ont été réalisés dans toutes les conditions étudiées. Pour un même essai, les Abs<sub>600nm</sub> initiales étaient toutes ajustées à la même valeur.

#### IV.3.2.2 - Evaluation de la dégradation par l'évolution du spectre d'absorption UV-visible des surnageants des cultures centrifugées

L'observation à l'oeil nu des cultures nous a montré qu'il y avait formation de composés solubles colorés, donc absorbant dans l'UV ou le visible.

Aussi, nous avons mesuré les spectres d'absorption entre 200 nm et 900 nm (capacité spectrale de notre spectrophotomètre Kontron Uvikon 860C) des surnageants de centrifugation des cultures précédemment décrites.

Nous n'avons indiqué dans les résultats que les spectres d'absorption de 200 à 600 nm car aucun produit absorbant entre 600 nm et 900 nm n'a été mis en évidence dans les surnageants de culture.

#### IV.3.2.3 - Evaluation de la dégradation par analyse en CLHP des surnageants des cultures centrifugées

L'apparition de nouveaux composés est mise en évidence par la mesure du spectre d'absorption UV-visible de leur mélange dans les surnageants de culture. Mais cette mesure est une analyse assez grossière, quoiqu'elle apporte des informations intéressantes.

Aussi, des composés ont été séparés par chromatographie en CLHP avec le matériel décrit au IV.1.4.3. Les solvants utilisés sont de qualité chromatographique. Le volume d'injection du surnageant filtré (filtres de diamètre 13 mm en acétate de cellulose, de porosité 0,45µm, Polylabo) varie de 20 à 200 µl.

L'élution est réalisée avec un gradient linéaire acétonitrile (solvant A) – eau milliQ à 0,01% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (solvant B) à 0,7ml/mn dans les conditions suivantes :

T= 0 mn	: 10% solvant A – 90% solvant B
T= 30 mn	: 60% solvant A – 40% solvant B
T= 32 mn	: 100% solvant A
T= 40 mn	: 100% solvant A
T= 50 mn	: 10% solvant A – 90% solvant B.

Des essais de couplage CLHP-DAD-MS (DAD=détecteur à barette de diodes et MS=spectromètre de masse) ont été réalisés au Laboratoire Central d'Analyses du C.N.R.S. de Solaize (69) par le Docteur Madeleine Flamant afin de caractériser les molécules séparées en chromatographie par leur spectre de masse. En effet, l'obtention des spectres d'absorption UV-visible ne permet pas l'identification des composés séparés. Dans ces essais, l'acide phosphorique est remplacé par de l'acide formique dans la phase mobile B. Le spectromètre de masse utilisé est un appareil Hewlett-Packard 5989A.

Les conditions utilisées pour la spectrométrie de masse sont les suivantes :

- Conditions APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) en mode positif :

Température quadripôle = 140°C

HED (High Energy Dynode) voltage = 10000V

Multiplicateur d'électrons (EM) = 2102

Température de désolvatation = 320°C

Gaz de désolvatation (azote) = 12

Température de nébulisation = 350°C

Gaz de nébulisation (azote) = 80 psi

Lentille d'entrée (EL) = variable

Sortie capillaire (CE) = 132V puis 100V au 2<sup>ème</sup> essai

Acquisition des masses entre 50 et 800 Da.

- Conditions ELECTROSPRAY (mode positif) :

Dilution du produit au 1/2 dans eau+acétonitrile+acide formique

Injection à un débit de 2µl/mn

Conditions quadripôle, HED, EM identiques aux précédentes

Gaz désolvatation (azote) = 60 à une température de 250°C

Gaz de nébulisation (azote) = 80 psi

EL variable et divers essais avec CE=100V, 200V, 250V entre les masses 50 et 2000 Da.

#### IV.3.2.4 - Etude de la biodégradation en spectrofluorimétrie

Cette étude est un suivi quantitatif de la disparition des HAP en solution aqueuse en présence des consortia sélectionnés. Cette méthode a déjà été utilisée pour le suivi de la biodégradation du phénanthrène en solution aqueuse (Putcha and Domach, 1993).

Pour cela, une solution de MSM est saturée avec les HAP individuels (fluoranthène, phénanthrène, pyrène ou anthracène) à 23°C, pendant 48 heures, sous agitation permanente, dans un flacon en verre fermé par un bouchon téfloné. Cette solution saturée est filtrée sur laine de verre et 150 ml sont placés dans un flacon en verre de 500 ml, fermé ensuite hermétiquement par un bouchon téfloné. Après autoclavage 20 mn à 121°C sous 1,5 bar, et refroidissement à température ambiante, la solution est additionnée d'inoculum des consortia (1,5ml à  $Abs_{600nm} = 1,5$ ) de façon que  $Abs_{600nm(Init)} = 0,015$  (assez faible pour ne pas perturber la fluorescence). Un témoin où l'inoculum est autoclavé est réalisé pour chaque condition. Une lecture de la fluorescence est réalisée ensuite régulièrement avec un spectrofluorimètre SPEX 1681, en excitant la solution à  $\lambda_{exc} = 254$  nm et en recueillant le spectre d'émission entre 254 nm et 600 nm. Les fentes utilisées sont de 2,5 mm.

Les essais ont été réalisés en utilisant le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène comme HAP saturants, et les consortia FT, PT, PY et AT non préadaptés.

### **IV.4 - Isolement et identification des micro-organismes composant les consortia**

#### **IV.4.1 - Composition des consortia**

La sélection de consortia de micro-organismes utilisant des HAP comme source de carbone menée précédemment a été réalisée à partir d'un sol naturel, pollué par des HAP,

donc contenant une grande variété de micro-organismes : bactéries, mais encore levures, champignons, etc...

Pour mettre en évidence la présence de levures et/ou de champignons dans les consortia sélectionnés, nous avons utilisé une gélose de Sabouraud supplémentée de gentamicine et de chloramphénicol (ANNEXE 1). Ces antibiotiques conjugués inhibent la croissance de la plupart des bactéries Gram+ et Gram- (protocole de coloration décrit dans l'ANNEXE 2-a), sans inhiber la croissance des levures ou champignons pour lesquels la gélose de Sabouraud est un milieu de croissance favorable.

Nous avons donc étalé 100µl de milieu de culture des consortia FT, PT, PY et AT sur de telles géloses. Nous avons laissé incuber 7 jours à 23°C. Après ce délai, les colonies ayant poussé ont été comptées et observées sur lame après coloration de Gram.

#### **IV.4.2 - Isolement et identification**

Avant de procéder à leur identification, nous avons dû procéder à l'isolement des différents micro-organismes composant ces consortia. La démarche que nous avons suivie au sein du laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Nord relève d'une démarche classique d'identification systématique après isolement sur milieu gélosé en boîte de Pétri des souches composant les consortia.

##### IV.4.2.1 - Protocole d'isolement

L'isolement des différentes souches constituant les consortia a été fait par la méthode des stries par épuisement : à l'aide d'une öse, une goutte de bouillon de culture (resp. PT, AT, FT, PY) est déposée sur des boîtes de Pétri contenant du bouillon nutritif gélosé (ANNEXE 1) et ensuiteensemencées par la méthode des stries par épuisement.

Les boîtes sont alors incubées dans une étuve à 30°C et les colonies, isolées ou non, morphologiquement différentes sont repiquées par la même technique sur gélose au sang de cheval ou au sang de mouton (ANNEXE 1). Ces géloses d'utilisation courante en microbiologie permettent de mieux différencier morphologiquement les souches que la gélose au bouillon nutritif et permettent de maintenir des germes assez exigeants.

Des repiquages sont réalisés par la méthode des stries par épuisement jusqu'à ce que les colonies présentes dans une même gélose soient toutes morphologiquement identiques, et que les colorations de Gram réalisées sur les colonies isolées soient uniformes.

Une fois l'isolement, sans doute non exhaustif, des souches composant les consortia réalisé, nous avons procédé à l'identification de celles-ci en utilisant une batterie de tests biochimiques et de croissance par l'intermédiaire de galeries commerciales d'identification bactérienne.

##### IV.4.2.2 - Protocole d'identification

Le principe des galeries d'identification est le suivant : il s'agit de réaliser une batterie de tests définis par le fabricant à l'aide de galeries d'identification. A partir des résultats (positifs ou négatifs) obtenus aux tests, un code est calculé puis comparé à une base de données, définie par le fabricant, contenant les codes correspondant aux différents types bactériens. Aussi, si la souche à identifier ne se trouve pas dans la base de données du fabricant, un problème d'identification se pose. C'est le problème de l'adéquation de la méthode d'identification à la souche à identifier : c'est pour cela qu'il est important de préciser la méthode d'identification avec le résultat.

Après isolement, nous avons donc d'abord déterminé le Gram des souches isolées, ainsi que la présence de catalase et de cytochrome oxydase (cf. IV.4.2.2.6).

Si une souche était Gram négative, elle était systématiquement testée sur une galerie BBL CRYSTAL™ Identification Systems Enteric/Nonfermenter Kit (Becton Dickinson). Si le test ne donnait pas de résultat d'identification, alors la souche était testée sur galerie API20NE (bioMérieux), puis sur une galerie MicroScan Neg Combo Type 4I (Dade Behring S.A.) si on n'avait pas de résultat avec la galerie API20NE, puis sur une galerie Rapid NFplus (Innovative System) et enfin sur une galerie MicroScan Neg/Urine Neg Combo Type 5I (Dade Behring S.A.) si aucune galerie n'avait donné de résultats satisfaisants en terme de probabilité dans les bases de données des fabricants.

Chaque fois qu'un résultat donnait une mauvaise probabilité, nous avons vérifié la pureté de la souche étudiée. Si elle était pure, alors nous testions la galerie suivante, sinon nous revenions au point de départ en procédant à de nouveaux isollements avant de procéder à une nouvelle identification à partir de la galerie BBL CRYSTAL.

Pour les souches à Gram positif (toutes des cocci), l'identification a été réalisée sur une galerie MicroScan Pos Combo Type 4I (Dade Behring S.A.).

#### IV.4.2.2.1 - Galeries MicroScan Pos Combo Type 4I (Dade Behring S.A.) pour bactéries à Gram positif.

Elles sont conçues pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques et l'identification au niveau de l'espèce, des cocci Gram positifs aérobies et des *Listeria monocytogenes*.

L'identification des *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Listeria monocytogenes* et *Aerococcus viridans* est réalisée au moyen de tests conventionnels chromogéniques. L'identification est basée sur la détection des changements de pH, l'utilisation des substrats, et la croissance en présence d'antibiotiques après 48 heures d'incubation à 30°C (ANNEXE 3). La production de  $\beta$ -lactamase est détectée par une méthode iodométrique.

Le livre de codage des germes Gram-positifs est utilisé pour l'identification de ces germes. Il a été conçu à partir d'une base de données MicroScan. Il est basé sur une analyse informatique de 24 tests pour les *Streptococcaceae* et de 18 tests pour les *Micrococcaceae*. Les résultats de ces tests sont transformés en un numéro de biotype à 8 ou 6 chiffres selon qu'il s'agit de *Streptococcaceae* ou de *Micrococcaceae*. En comparant le numéro de biotype obtenu pour la souche inconnue à ceux contenus dans la base de données, on obtient un résultat sous la forme d'un nom d'espèce bactérienne avec une probabilité et une typicité supérieures à 85%. Pour des probabilités plus faibles, le biocode obtenu peut correspondre à plusieurs espèces (5 au maximum) qui sont proposées au choix de l'investigateur.

#### IV.4.2.2.2 - Systèmes d'Identification BBL CRYSTAL™, Trousse d'identification des entérobactéries/non fermentants (Becton Dickinson).

Le système BBL CRYSTAL E/NF pour l'identification des entérobactéries/non fermentants est une méthode d'identification miniaturisée employant des substrats chromogènes et conventionnels modifiés. Il a pour but d'identifier les bactéries aérobies à Gram-négatif ayant une importance clinique et appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, ainsi que certaines bactéries à Gram-négatif rencontrées en clinique humaine, parmi les plus fréquemment isolées, fermentant ou ne fermentant pas le glucose.

Un grand nombre de tests utilisés dans les systèmes d'identification BBL CRYSTAL sont des modifications des méthodes classiques. Ceux-ci comprennent des tests de fermentation, d'oxydation, de dégradation et d'hydrolyse de différents substrats. De plus, il existe des substrats couplés à un chromogène pour détecter les enzymes qui les utilisent pour les métaboliser.

La trousse BBL CRYSTAL est composée de couvercles BBL CRYSTAL E/NF, de bases BBL CRYSTAL, de tubes de solution BBL CRYSTAL pour l'inoculum. Le couvercle BBL CRYSTAL contient 30 substrats déshydratés situés à l'extrémité de pointes en plastique. La base BBL CRYSTAL comprend 30 puits réactionnels. L'inoculum à tester est préparé à l'aide de la solution BBL CRYSTAL pour l'inoculum et permet de remplir la totalité des 30 puits de la base BBL CRYSTAL. Lorsque le couvercle est dans l'alignement de la base et correctement emboîté, l'inoculum à tester réhydrate les substrats lyophilisés et déclenche les réactions des différents tests.

Après une période d'incubation de 24 à 72 heures (fonction de la vitesse de croissance de la souche étudiée), les puits sont examinés afin de déceler tout changement de coloration. Ces changements de coloration ont pour origine l'activité métabolique des micro-organismes. L'ensemble des résultats des 30 réactions est converti en un profil numérique à 10 chiffres qui sert de base à l'identification. Les résultats des réactions enzymatiques et biochimiques des 30 substrats BBL CRYSTAL obtenus avec une large gamme de micro-organismes sont stockés dans la base de données BBL CRYSTAL E/NF. L'identification BBL CRYSTAL repose sur l'analyse comparative des résultats des réactions obtenus sur l'isolat avec ceux contenus dans la base de données.

Les tests utilisés dans le système d'identification BBL CRYSTAL E/NF reposent également sur l'utilisation et la dégradation par les bactéries de substrats spécifiques révélées par différents indicateurs. Les réactions de fermentation permettent de déterminer la capacité d'un isolat à métaboliser des sucres en l'absence de l'oxygène atmosphérique. Les réactions d'oxydation reposent sur la capacité d'un organisme à métaboliser le substrat en présence d'oxygène comme accepteur final d'électrons. Ces deux types de réaction sont généralement détectés grâce à l'emploi d'un indicateur de pH contenu dans les substrats tests. L'hydrolyse des substrats chromogènes entraîne des changements de coloration détectables à l'œil nu. De plus, d'autres tests permettent également de détecter la capacité d'un organisme à hydrolyser, dégrader, réduire ou utiliser autrement un substrat (ANNEXE 4).

Par comparaison avec une base de données, on obtient le résultat sous la forme d'une ou plusieurs des combinaisons suivantes : (nom de souche, nombre 1, nombre 2). Nombre 2 est la probabilité pour que la souche donnée soit la bonne, nombre 1 correspond à la probabilité pour que, au sein de la souche choisie, le biotype calculé soit réellement observé (typicité).

Par exemple, si le résultat donné est (*Pseudomonas aeruginosa* ; 151; 0,98), alors la probabilité pour que la souche inconnue soit une *Pseudomonas aeruginosa* est de 98% et 1 *Pseudomonas aeruginosa* sur 151 présente les caractères indiqués. Au-delà de 25000, on parlera de souche atypique.

#### IV.4.2.2.3 - Système d'identification des bacilles Gram-négatif non-entérobactéries : API20NE (bioMérieux)

API 20NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation, pour l'identification des bacilles Gram-négatif non entérobactéries et non

fastidieux (ex : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.).

La galerie API20NE comporte 20 microtubes contenant milieux et/ou substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimal et les bactéries croissent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant (ANNEXE 5). La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

#### IV.4.2.2.4 - Identification rapide des bactéries non fermentantes : **RapID NF Plus** (Innovative System).

RapID NF Plus est une micro-méthode enzymatique qualitative pour identifier plus de 50 espèces de bactéries médicalement importantes ne fermentant pas le glucose et quelques espèces fermentant le glucose mais n'appartenant pas au groupe des *Enterobacteriaceae*, à l'aide de tests traditionnels et de substrats chromogènes. RapID NF Plus identifie les bactéries des genres suivants : *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinobacillus*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Bordetella*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Kingella*, *Methylobacterium*, *Moraxella*, *Oligella*, *Pasteurella*, *Sphingobacterium*, *Suttonella*, *Weeksella*, *Comamonas*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* et *Vibrio*. RapID NF Plus se compose d'une galerie et de réactifs NF Plus. Chaque galerie comprend 10 cupules contenant chacune un ou plusieurs réactifs déshydratés. La forme de la galerie permet un ensemencement simultané des 10 cupules. La suspension bactérienne réhydrate les substrats et la galerie est incubée 6 heures à 37°C en atmosphère aérobie. Les résultats sont déterminés en caractères positifs ou négatifs selon les changements de couleur (ANNEXE 6). L'ensemble des résultats est regroupé sous forme d'un code qui, comparé à une base de données, indique l'identification de la bactérie avec le pourcentage de probabilité et les similitudes éventuelles avec d'autres bactéries.

#### IV.4.2.2.5 - **MicroScan Neg Combo Type 4I et Microscan Neg/Urine Combo Type 5I** (Dade Behring S.A.)

Les plaques Microscan sont conçues pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques et l'identification au niveau de l'espèce des bacilles Gram-négatif aérobies et aérobies facultatifs.

L'identification des bacilles Gram-négatifs fermenteurs et non-fermenteurs est réalisée au moyen de tests conventionnels et chromogéniques (ANNEXE 7). L'identification est basée sur la détection de changement de pH, l'utilisation de substrats et la croissance en présence d'antibiotiques après 15-42 heures d'incubation à 30°C.

L'interprétation des résultats est faite de manière similaire à celle décrite au IV.4.2.2.1 pour les galeries MicroScan Pos Combo Type 4I, avec une autre base de données (pour les bactéries à Gram-négatif).

#### IV.4.2.2.6 - **Tests complémentaires**

**Test oxydase** : pour déterminer la présence de la cytochrome oxydase dans les souches isolées, un disque de « réactif oxydase » (tétraméthyl-p-phénylène diamine) est placé sur du papier filtre et imbibé d'une solution NaCl 0,9%. Une petite quantité de colonie bactérienne est placée sur le disque et la diffusion du réactif sur le papier filtre provoque l'apparition



d'une coloration violette pour les bactéries contenant la cytochrome oxydase. Sinon, elles conservent leur aspect initial.

**Test catalase** : pour déterminer la présence de la catalase dans les souches isolées, on ajoute de l'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) à une suspension de la souche étudiée. Si la catalase est présente, il y a formation de bulles.

**Mobilité** : une suspension de la souche étudiée est mise sur lame et observée au microscope optique au grossissement 40.

**Pousse à 42°C** : ce test a été réalisé pour les souches suspectées, après tests d'identification sur galeries, d'appartenir aux espèces *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas putida*. Pour cela, une suspension de la souche étudiée est étalée sur une gélose pour *Pseudomonas* et incubée de 24 à 72 heures dans une étuve à 42°C. Les *Pseudomonas aeruginosa* peuvent en général se cultiver à 42°C, mais pas les *Pseudomonas putida*.

**Résistance au C390** : le C390 (Rosco-Eurobio) est un composé utilisé pour contribuer à l'identification des souches de l'espèce *Pseudomonas*. Pour cela, une suspension de la souche étudiée est étalée sur une gélose de Mueller-Hinton, puis un disque de C390 est déposé et la boîte est incubée à 30°C de 24 à 48h. Les souches sont déclarées résistantes au C390 si le diamètre d'inhibition de la croissance bactérienne autour du disque de bactéricide est inférieur à 15 mm. Les *Pseudomonas aeruginosa* sont résistants au C390, mais pas les autres espèces de *Pseudomonas*.

#### IV.5 – Inoculation de microcosmes de sol pollué avec les consortia PT, AT, FT et PY

Le protocole des essais réalisés ici est sensiblement le même qu'au IV.2 en ce qui concerne le dispositif expérimental, l'aération et les prélèvements pour les mesures.

Nous avons ici travaillé avec le sol pollué issu de la deuxième campagne d'échantillonnage sur le site de juin 1996. Le pH était de 7,2 et l'humidité du sol ajustée à 20%.

Les absorbances à 600 nm des inocula utilisés dans la suite ont toutes été ajustées à 1,5 avant l'inoculation des microcosmes de sol.

##### IV.5.1 - Sol stérilisé par autoclavage, inoculé avec les consortia à 23°C

Les échantillons de sol utilisés ici ont été autoclavés (20 mn à 1,5 bar, 121°C) 3 fois à des intervalles de 24 h.

Le suivi a été réalisé sur 83 jours.

	Inoculum	Volume (ml) d'inoculum	Sol sec (g)	Notation et chapitre
Bocal n°1	Non inoculé	0	134,7	Contrôle au VIII.1.1 Témoin à 23°C au VIII.1.2
Bocal n°2	AT	2	126,7	AT1 au VIII.1.1
Bocal n°3	AT	4	133,2	AT2 au VIII.1.1 AT à 23°C au VIII.1.2
Bocal n°4	PY	2	130,6	PY1 au VIII.1.1
Bocal n°5	PY	4	131,3	PY2 au VIII.1.1 PY à 23°C au VIII.1.2
Bocal n°6	FT	2	133,5	FT1 au VIII.1.1
Bocal n°7	FT	4	133,1	FT2 au VIII.1.1 FT à 23°C au VIII.1.2
Bocal n°8	PT	2	139,8	PT1 au VIII.1.1
Bocal n°9	PT	4	135,4	PT2 au VIII.1.1 PT à 23°C au VIII.1.2

#### IV.5.2 - Sol stérilisé ou non par autoclavage, inoculé avec les consortia à 30°C

Les échantillons de sol autoclavés utilisés ici ont été autoclavés (20 mn à 1,5 bar, 121°C) 3 fois à des intervalles de 24 h. Le suivi a été réalisé sur 90 jours.

	Inoculum	Volume (ml) d'inoculum		Sol sec (g)	Notation et chapitre
Bocal n°1		0	Autoclavé	105,1	Témoin à 30°C au VIII.1.2
Bocal n°2	FT	4	Autoclavé	113,4	FT à 30°C au VIII.1.2
Bocal n°3	AT	4	Autoclavé	106,9	AT à 30°C au VIII.1.2
Bocal n°4	PY	4	Autoclavé	111,0	PY à 30°C au VIII.1.2
Bocal n°5	PT	4	Autoclavé	117,0	PT à 30°C au VIII.1.2
Bocal n°6	PY	4		129,5	Non autoclavé + PY au VIII.2
Bocal n°7	AT	4		130,9	Non autoclavé + AT au VIII.2
Bocal n°8		0		122,3	Non autoclavé au VIII.2



**RESULTATS**  
**ET**  
**DISCUSSION**



## CHAPITRE V :

### ETUDE DE LA BIODEGRADATION NATURELLE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) EN MICROCOSMES DE SOL

#### INFLUENCE DE QUELQUES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX

Nous avons prélevé des échantillons de sol sur un site d'ancienne usine à gaz pollué par des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Ce site est un site sur lequel la société ICF Environnement devait à l'époque procéder à une dépollution en terre biologique. C'est pourquoi elle était intéressée de mieux connaître le processus et les capacités naturelles de dépollution.

Nous avons procédé à deux échantillonnages sur ce site, à environ 1 an d'intervalle. Le premier échantillonnage a été fait avant la mise en route de la dépollution *in situ*. Le deuxième a été réalisé en cours de dépollution.

Nous avons d'abord procédé au tamisage à 2 mm des échantillons de sol prélevés sur le site qui nous sert de base d'étude. La fraction supérieure à 2 mm, constituée de cailloux et graviers, n'est un réservoir ni de pollution ni de nutriments.

La fraction inférieure à 2 mm est celle communément utilisée dans la littérature pour la caractérisation physico-chimique et microbiologique des sols, pour la caractérisation de leur pollution ainsi que dans les études de biodégradation.

Dans ce chapitre, lorsque nous calculons les taux de dégradation des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A., nous prenons en fait en compte le cumul des pertes biotiques et abiotiques du sol en ces composés.

Toutefois, des expériences ultérieures, exposées au Chapitre VIII, ont montré qu'il n'y a pas disparition de 13 HAP sur les 16 tant que le sol utilisé demeure **stérile**.

Seules les teneurs en naphthalène, acénaphthylène et acénaphène diminuent dans le sol pollué stérile sous l'effet des pertes abiotiques. Toutefois ces pertes sont moins élevées qu'en présence de micro-organismes dans le sol.

Aussi, nous parlerons bien de biodégradation, tout en sachant qu'en fait nous tenons compte des pertes biotiques et abiotiques en HAP du sol pollué considéré.

#### V.1 – Caractérisation du sol utilisé

Nous avons caractérisé, après tamisage à 2 mm, le sol prélevé en termes de pH, d'humidité, de teneur en azote, phosphore, nitrates, ammoniacque, de microflore et de pollution par les 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A..

##### V.1.1 – Caractérisation physico-chimique

La mesure du pH à l'eau ( $pH_{\text{eau}}$ , dit pH du sol) rend compte de l'activité des ions  $H_3O^+$  présents dans la phase aqueuse surnageante (cf. IV.1.2.3).



Le pH au KCl ( $pH_{\text{KCl}}$ , dit pH d'échange) correspond à l'activité des ions  $H_3O^+$  initialement à l'état dissocié et des ions  $H_3O^+$  échangés. Sa valeur est en général inférieure à  $pH_{\text{eau}}$ .  $\Delta pH = pH_{\text{eau}} - pH_{\text{KCl}}$  révèle l'acidité d'échange.



Dans notre cas (Tableau V.1.1-a),  $\text{pH}_{\text{eau}} = 7,21$  et  $\Delta\text{pH} = 0,01$ , donc le pH du sol est proche de la neutralité et l'acidité d'échange peut être considérée comme nulle. Ce sol est donc peu susceptible de poser un problème (au niveau acidité) car les sols avec un pH entre 6 et 9 sont des sols à faible risque selon (E.R.L., 1987).

En effet, les sols à pH acide ont eux le potentiel d'affecter une variété de cibles. Les sols contaminés par l'oxyde épuisé ont souvent des pH de l'ordre de 2, cette pollution est donc très certainement absente de notre prélèvement. En conditions acides, du cyanure d'hydrogène (HCN) peut être généré à partir des cyanures libres, du sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) à partir des sulfures, la mobilité des métaux peut être augmentée... Ce type de problèmes ne doit donc *a priori* pas exister dans nos échantillons de sol.

En outre, le pH recommandé pour une biodégradation optimale des hydrocarbures est entre 7 et 8 (Thomas and Lester, 1993a), un ajustement de pH, non nécessaire ici par conséquent, pouvant être un prérequis à la mise en place des procédés de biorémédiation.

Un pH du sol de 7,2 devrait être favorable aux populations bactériennes par rapport aux populations fongiques, les pH optimaux de ces populations étant respectivement de 6 à 8 et 4 à 5.

	Nos mesures	Thomas et al. (1991)
<b>Fraction inférieure à 2 mm</b>	50%	
<b>% humidité</b>	14,8 ± 0,3	
<b>W.H.C. (capacité de rétention de l'eau)</b>	54%	
<b>pH<sub>eau</sub></b>	7,21	
<b>pH<sub>KCl</sub></b>	7,20	
<b><math>\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{eau}} - \text{pH}_{\text{KCl}}</math></b>	0,01	
<b>Azote Kjeldahl (mg/kg de sol sec)</b>	1510	
<b>Ammonium extractible au KCl (mg/kg de sol sec)</b>	45,2 ± 0,7	85,5 à 2105
<b>Nitrates extractibles au KCl (mg/kg de sol sec)</b>	6,0 ± 0,9	1 à 7,3
<b>Sulfates extractibles à l'eau (mg/kg de sol sec)</b>	9580 ± 408	568 à 16309
<b>Phosphore assimilable (méthode Duchaufour et Bonneau) ou Phosphates disponibles (mg/kg de sol sec)</b>	0,65±0,05  52±4	  4,6 à 32

**Tableau V.1.1-a :** Quelques caractéristiques physico-chimiques du sol prélevé et valeurs relevées par Thomas et al. (1991) sur 2 sites d'ancienne usine à gaz.

La teneur en sulfates extractibles à l'eau (protocole décrit au IV.1.2.4) est de 9580±408 mg/kg (Tableau V.1.1-a). Thomas et al. (1991) ont mesuré des valeurs de 568 à 16309 mg/kg sur 2 sites d'ancienne usine à gaz.

Le seuil critique en sulfates totaux est de 2000 mg/kg et le seuil d'action de 10000 mg/kg pour les utilisations domestiques et les lotissements, contre 20000 mg/kg pour les immeubles (E.R.L., 1987). En fait, ces teneurs sont critiques surtout si le sol est acide, ce qui

n'est pas le cas ici. La teneur en sulfates du sol est donc à la limite d'être considérée comme une pollution.

Par la méthode Duchaufour-Bonneau (cf. IV.1.2.6), le phosphore assimilable, ou les phosphates (forme du phosphore dans le sol) disponibles, est évalué. La teneur en phosphates est de  $52 \pm 4$  mg/kg (Tableau V.1.1-a), ce qui est supérieur aux valeurs mesurées par Thomas et al. (1991) qui allaient de 4,6 à 32 mg/kg. Ils n'avaient pratiqué qu'une extraction acide, alors que la méthode Duchaufour-Bonneau est composée d'une extraction acide pour les phosphates liés au calcium et d'une extraction basique pour les phosphates liés à l'aluminium, le fer et les humophosphates.

En ce qui concerne l'azote du sol, l'évaluation de la teneur en azote total par la méthode Kjeldahl a donné 1510 mg/kg de N.

En ammonium et nitrates extractibles au KCl, nous avons mesuré respectivement des teneurs de 45,2 et 6,0 mg/kg, alors que Thomas et al. (1991) ont trouvé des valeurs de 85,5 à 2105 mg/kg et de 1 à 7,3 mg/kg. Nous nous trouvons donc dans les mêmes ordres de grandeur. Ces valeurs correspondent à de l'azote disponible pour les micro-organismes.

La fraction grossière (>2 mm) du sol utilisé constitue 50% (Tableau V.1.1-a) du prélèvement effectué sur le site. Nous avons analysé la fraction inférieure à 1 mm (seuil maximum de l'appareil) au granulomètre Laser en utilisant l'eau comme liquide porteur. Dans cette fraction, 60% des particules ont un "diamètre" inférieur à 63  $\mu\text{m}$  (argiles et limons) et 40% un "diamètre" supérieur à 63  $\mu\text{m}$  (sables).

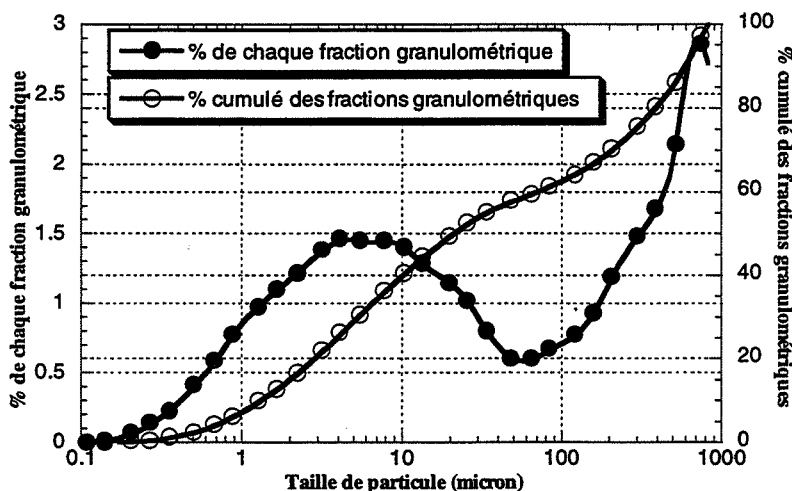


Figure V.1.1-a : Analyse en granulométrie Laser de la fraction inférieure à 1 mm.

### V.1.2 – Caractérisation de la pollution par les HAP

Nous avons fait analyser un échantillon (après tamisage et homogénéisation) du sol prélevé par le Laboratoire Crépin (Rouen) en termes de teneur en les 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. (Tableau V.1.2-a). Parallèlement, nous avons procédé à la même analyse au sein de notre laboratoire (cf. protocole au IV.1.4).

Les modes de préparation des échantillons utilisés dans les deux cas sont une extraction au Soxhlet sur la nuit avec un mélange équimolaire acétone-hexane, suivie d'un passage (pré-chromatographie) sur gel de silice et enfin analyse en CLHP.

Le laboratoire Crépin utilise une double détection en CLHP : couplage en série d'un détecteur UV à barrette de diodes (analyse quantitative et acquisition des spectres



d'absorption) et d'un détecteur fluorimétrique (analyse quantitative). Le détecteur fluorimétrique permet la détection de plus faibles quantités de HAP. Nous ne disposons au laboratoire que d'un détecteur UV à barrette de diodes, par conséquent nos mesures sont moins précises et nous avons tendance à majorer les teneurs en HAP par rapport aux mesures faites avec le couplage.

La double détection permet à la fois de quantifier les HAP absorbant dans l'UV et émettant ou non de la fluorescence. L'acquisition des spectres d'absorption UV-visible des composés séparés pendant l'élution avec le détecteur à barrette de diodes permet de définir la pureté des pics chromatographiques. Si des impuretés (i.e. des produits autres que les HAP) apparaissent, il y a davantage de chances de les éliminer de la quantification avec la double détection.

Aussi, globalement, nos mesures sont similaires à celles faites chez Crépin (Tableau V.1.2-a). Notre méthode d'analyse (i.e. la séquence extraction, passage sur silice, CLHP) semble donc tout à fait satisfaisante.

Nous observons que ce sont surtout les teneurs en HAP de 4 cycles qui sont majorées dans notre analyse. En effet, les pics chromatographiques qui correspondent aux HAP de 4 cycles sont moins bien séparés que les autres : une "forêt" de pics non identifiés apparaît, qui perturbe les mesures et les calculs.

Nom des 16 HAP cibles selon l'U.S. E.P.A.	Laboratoire Crépin (Méthode NF X 31 417) (mg/kg de sol sec)		ENSMSE (Méthode EPA 3540) (mg/kg de sol sec)	
Naphtalène	31,2	64,3	32,5	32,5
Acénaphtylène	Inf. à 2		Inf. à 2	
Acénaphène	33,1		Inf. à 2	
Fluorène	136,2	590,6	146,5	605,8
Phénanthrène	317,1		296,0	
Anthracène	137,3		163,3	
Fluoranthène	289,9	733,0	374,7	970,8
Pyrène	233,0		271,0	
Benzo(a)anthracène*	125,2		201,9	
Chrysène*	84,9		123,2	
Benzo(b)fluoranthène*	74,9	253,6	79,9	221,1
Benzo(k)fluoranthène*	45,0		40,3	
Benzo(a)pyrène*	96,3		78,1	
Dibenzo(a,h)anthracène	37,4		22,8	
Benzo(g,h,i)pérylène	49,6	87,9	50,1	85,0
Indéno(1,2,3-cd)pyrène*	38,3		34,9	
<b>HAP totaux</b>	<b>1729</b>		<b>1915</b>	
<b>HAP cancérigènes*</b>	<b>465</b>		<b>558</b>	

Tableau V.1.2-a : Analyse de la pollution du sol prélevé en termes de teneur en Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). \* : HAP suspectés être cancérigènes.

Toutefois, comme nous allons dans la suite chercher à évaluer l'évolution de la teneur en HAP du sol au cours d'essais de biodégradation, c'est la tendance qui est la plus importante pour nous. Nous avons conscience de la majoration des valeurs mesurées, mais nous nous intéresserons dans la suite à l'existence et l'étendue de la biodégradation de ces produits : notre méthode d'analyse de la teneur en HAP du sol est donc largement satisfaisante

Ainsi, la teneur en HAP totaux du sol est de 1729 mg/kg pour Crépin et 1915 mg/kg selon nous : dans les 2 cas, elle est au-dessus du seuil d'action de 500 mg/kg (E.R.L., 1987). Ce sol est donc réellement considéré comme pollué par les HAP. Ce seuil correspond à la teneur maximale tolérable dans un sol, le seuil de surveillance étant lui de 50 mg/kg en HAP totaux. La teneur en HAP cancérigènes représente 27 % pour Crépin et 29% pour nous de la teneur totale en les 16 HAP cibles.

Les HAP de 3 et 4 cycles représentent la majorité de la pollution : 77% pour Crépin et 82% pour nous. Les HAP de 2, 5 et 6 cycles ne représentent que respectivement 3%, 15% et 5% de la pollution pour Crépin et 2%, 12% et 4% pour nous. Nous constatons donc que la répartition de la pollution en fonction du nombre de cycles des HAP est tout à fait similaire dans les deux modes d'analyse.

### V.1.3 – Caractérisation microbiologique

Nous avons évoqué au I.2.5 que les bactéries et les Actinomycètes sont les populations majoritaires du sol avec des dénombrements aux alentours de  $10^8$  et  $10^5$  à  $10^6$  UFC/g respectivement, contre  $10^5$  pour les champignons (Bonneau et Souchier, 1994).

Nous avons dénombré (Tableau V.1.3-a) entre 40 et  $50.10^6$  UFC/g de bactéries et Actinomycètes et entre 1 et  $2.10^6$  UFC/g de levures et champignons. Une teneur en microflore indigène totale de  $50.10^6$  UFC/g nous a également été donnée par le Laboratoire Crépin (Rouen). Nous sommes donc proches des teneurs citées précédemment : la population microbienne de ce sol pollué est tout à fait satisfaisante en termes de quantité. On peut donc s'attendre à observer des micro-organismes capables de dégrader des HAP puisque la pollution par les HAP est ancienne. Les processus d'adaptation à la dégradation ont donc sans doute eu le temps de se mettre en place et de se développer.

<b>Bactéries et Actinomycètes</b>	40 à $50.10^6$ UFC / g de sol sec
<b>Levures et Champignons</b>	1 à $2.10^6$ UFC / g de sol sec

Tableau V.1.3-a : Quantification de la population microbienne du sol prélevé.

Thomas et al. (1991) ont dénombré la population microbienne de différents échantillons de sols issus de deux sites d'ancienne usine à gaz sur 2 types de gélose à pH=7,0. Ils ont dénombré de 0 (minimum) à  $7,2.10^9$  UFC/g (maximum). La majorité des échantillons se situaient autour de  $10^7$  UFC/g. Nous sommes donc au-dessus de cette teneur ici, ce qui semble plutôt favorable car cela signifie qu'une population microbienne active existe dans le sol prélevé.

## V.2 – Etude de la biodégradation naturelle à 23°C en microcosmes de sol

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence les capacités naturelles du sol échantillonné vis-à-vis de la dégradation des HAP.

En effet, nous avons vu précédemment (cf. introduction et III.5.2.2) qu'une démarche possible pour améliorer le processus de biodégradation des HAP dans le sol est la sélection de micro-organismes, issus de ce sol, capables de transformer les HAP.

Or, nous avons vu au I.4.1 que l'acquisition de capacités de dégradation par des micro-organismes peut être un processus long, en particulier si une adaptation génétique est nécessaire.

Ainsi, si le sol échantillonné ne possédait pas déjà une microflore capable de dégrader les HAP, le processus de sélection aurait été trop long pour nous permettre la sélection de micro-organismes dans le cadre de la thèse.

En outre, cette étude nous permet de cibler les HAP biodégradables naturellement par les micro-organismes indigènes, et qui nous permettront de réaliser une sélection efficace. Il est en effet important de savoir si tout ou partie des HAP présents dans le sol sont de bons sujets pour procéder à une sélection de micro-organismes capables de les dégrader.

Nous avons donc procédé à l'étude de la dégradation des HAP dans le sol naturel par la mesure de la teneur en HAP de portions (microcosmes) de sol.

Pour cela, nous avons réalisé différentes conditions d'incubation afin de déterminer si la modification de certains paramètres environnementaux améliorerait ou non la biodégradation.

Nous avons ainsi mené deux séries d'expériences avec le sol prélevé (1<sup>er</sup> prélèvement caractérisé au V.1), le nombre d'essais ayant été limité par la quantité de sol disponible et le temps de préparation des échantillons. Il y a eu deux séries d'expériences, car des problèmes de mise au point de techniques analytiques nous ont contraints à limiter les premiers essais.

Les études ont été menées à 23°C, température de la chambre d'incubation disponible au laboratoire. Cette température est un compromis qui permet le travail de différentes personnes simultanément. Elle correspond aussi généralement à une activité microbienne « satisfaisante », donc nous convenait pour cette raison également.

Nous avons travaillé à des taux d'humidité du sol de 20% et de 27%, qui correspondent respectivement à 37% et 50% de la W.H.C. du sol étudié ici.

La fourchette des conditions optimales en humidité du sol préconisée généralement est 25 à 80% de la W.H.C. (cf. Tableau I.3-a). Comme nous souhaitons plutôt mettre en évidence la biodégradation aérobie (pour la sélection de micro-organismes aérobies par la suite) des HAP, nous avons choisi une humidité du sol dans la fourchette inférieure préconisée (Atlas and Bartha, 1993).

En outre, nous souhaitons nous placer dans une situation proche de la réalité du terre biologique mis en place par ICF Environnement et où nos échantillons ont été prélevés. Des taux d'humidité plus élevés auraient sans doute amélioré l'activité dégradatrice des micro-organismes présents dans le sol, mais n'auraient pas été réaliste car nous aurions obtenu une boue non représentative de la réalité des terres biologiques.

La 1<sup>ère</sup> série d'expériences a été réalisée dans les conditions (cf. IV.2.2) suivantes :

**Condition 1** : 20% d'humidité et  $\text{pH}_{\text{eau}}=7,2$ ,

**Condition 2** : 20% d'humidité,  $\text{pH}_{\text{eau}}=7,2$  et 30% (w/w) sciure.

L'aération manuelle est hebdomadaire.

La sciure a été prélevée sur le site à dépolluer, où elle avait été additionnée pour améliorer la biodégradation des HAP par un apport en champignons filamenteux (issus de la sciure en décomposition, donc du bois) notamment. Nous voulions donc nous assurer de l'intérêt réel de cette addition.

Afin de déterminer l'influence de cette humidité sur la biodégradation, la 2<sup>ème</sup> série d'essais a été réalisée à 27% d'humidité, soit 50% W.H.C..

C'est la **condition 3** : 27% d'humidité ;  $pH_{\text{cau}}=7,2$ .

Le pH naturel du sol étant de 7,2, nous avons vu qu'il est donc plutôt favorable aux populations bactériennes, le  $pH_{\text{optimum}}$  des populations fongiques étant plus acide. Aussi, afin de déterminer si ce pH favorise réellement les bactéries au détriment des champignons, nous avons fait un essai en ajustant le pH du sol à 5,3.

C'est la **condition 4** : 27% d'humidité et  $pH_{\text{cau}}=5,3$ .

Enfin, afin de déterminer si l'addition de sciure a la même influence à  $pH_{\text{cau}}=5,3$  qu'à  $pH_{\text{cau}}=7,2$ , nous avons travaillé sur une dernière condition.

C'est la **condition 5** : 27% d'humidité,  $pH_{\text{cau}}=5,3$  et 30%(w/w) sciure.

Dans les 5 conditions étudiées, les échantillons de sol utilisés proviennent du même prélèvement sur site.

Toutefois, entre les deux séries d'expériences, le sol non utilisé (qui servira dans la 2<sup>ème</sup> série) a été conservé à +4°C à l'obscurité dans un bocal en verre fermé hermétiquement. Nous avons mesuré la teneur en HAP à la mise en route de chaque série d'expériences. Des modifications sont apparues entre les 2 séries, une biodégradation ayant vraisemblablement eu lieu dans l'échantillon de sol conservé à +4°C.

Le Tableau V.2-a donne les teneurs mesurées pour les deux conditions de mise en route des expériences.

	Série 1		Série 2	
	(mg/kg de sol sec)		(mg/kg de sol sec)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Naphtalène	32,5	2,3	6,7	0,2
Acénaphthylène	Inf. à 2		40,2	5,0
Acénaphène	Inf. à 2		Inf. à 2	
Fluorène	146,5	0,1	38,5	2,5
Phénanthrène	296,0	13,8	97,7	3,0
Anthracène	163,3	27,7	63,1	2,0
Fluoranthène	374,7	22,9	293,0	13,1
Pyrène	271,0	24,7	202,4	10,2
Benzo(a)anthracène*	201,9	5,2	145,1	12,1
Chrysène*	123,2	2,9	141,7	15,3
Benzo(b)fluoranthène*	79,9	5,4	118,2	25,0
Benzo(k)fluoranthène*	40,3	5,4	71,6	7,4
Benzo(a)pyrène*	78,1	5,0	100,1	10,1
Dibenzo(a,h)anthracène	22,8	1,8	79,0	5,1
Benzo(g,h,i)pérylène	50,1	0,3	80,7	5,2
Indéno(1,2,3-cd)pyrène*	34,9	0,4	73,2	7,2
HAP totaux	1915	117,9	1551	123,4
HAP cancérigènes*	558	24,3	650	77,1

**Tableau V.2-a** : Teneurs initiales (en mg/kg de sol sec) en HAP du sol utilisé dans les 2 séries d'expériences. \* : HAP suspectés être cancérigènes.

Dans la suite, nous procéderons aux comparaisons entre les différentes conditions de dégradation de la façon suivante :

- Condition 1 avec Condition 2,
- Condition 3 avec Condition 4 et Condition 5.

Nous pourrions comparer la biodégradation dans les conditions 1 et 3 en prenant en compte les différences des teneurs initiales en HAP dans les 2 séries d'expériences.

La réalisation de témoins de sol autoclavés (donc stériles) nous a montré qu'aucune disparition des HAP étudiés, sauf le naphthalène, l'acénaphthylène et l'acénaphène, n'est mise en évidence tant que la stérilisation est effective (l'autoclavage n'est pas une stérilisation définitive pour le sol : certains micro-organismes résistent, redeviennent actifs après un certain temps et colonisent le sol à nouveau).

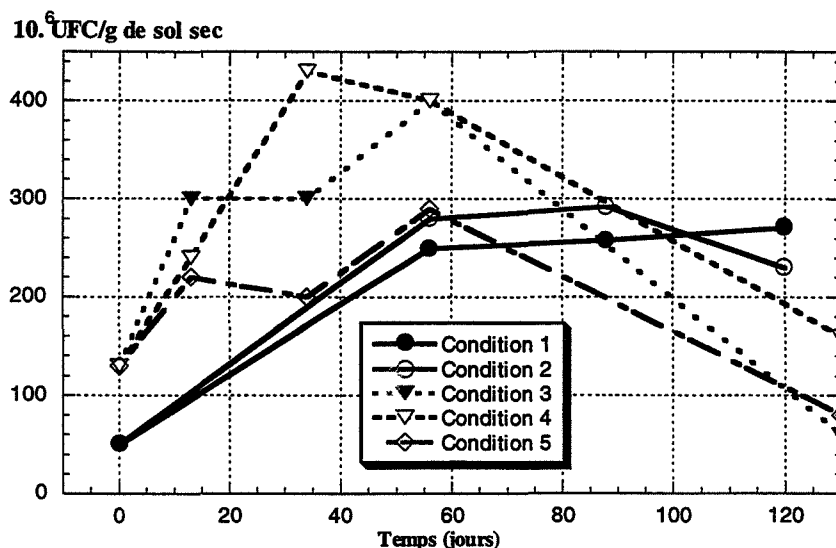
Aussi, la disparition des HAP observée dans les conditions 1 à 5 correspond bien à une biodégradation, sauf pour le naphthalène, l'acénaphthylène et l'acénaphène, où nous observons en fait le cumul des pertes biotiques et abiotiques.

Dans la suite, quand nous évoquerons les HAP de 3 cycles, il s'agira de fluorène, phénanthrène et anthracène, car l'acénaphthylène et l'acénaphène ont des comportements différents.

Nous exprimerons cette biodégradation en termes de taux de dégradation par rapport à la teneur initiale (en %), de façon à limiter le nombre de graphes et obtenir des échelles lisibles.

### V.2.1 – Evolution de la population microbienne

Les niveaux de populations initiaux sont différents dans les 2 séries d'essais, comme les différences de teneur en HAP dues à la conservation de l'échantillon de la 2<sup>ème</sup> série à +4°C nous le laissait supposer.



**Figure V.2.1-a :** Population microbienne (bactéries et Actinomycètes) des microcosmes de sol dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30%(w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30%(w/w) sciure.

Nous voyons sur la Figure V.2.1-a que la population microbienne de bactéries et Actinomycètes est quasiment identique (en nombre) dans les conditions 1 et 2. L'apport de sciure dans la condition 2 ne favorise donc pas particulièrement cette population à pH=7,2.

De même, dans les conditions 3 et 4 (pH=7,2 et pH=5,3 respectivement), la modification du pH du sol n'a que peu d'influence sur le niveau de cette population : cette dernière est même plus élevée dans la condition 4 à 35 jours, alors que cette baisse de pH devrait plutôt être défavorable à ces populations qui, en général, ont des pH optima plutôt proches de 7.

Par contre, cette population microbienne est plus faible (en nombre) dans la condition 5 par rapport aux conditions 3 et 4 : cela semble paradoxal car la biodégradation est plus rapide dans la condition 5 que dans les conditions 3 et 4, comme nous le verrons aux V.2.2 et V.2.3.

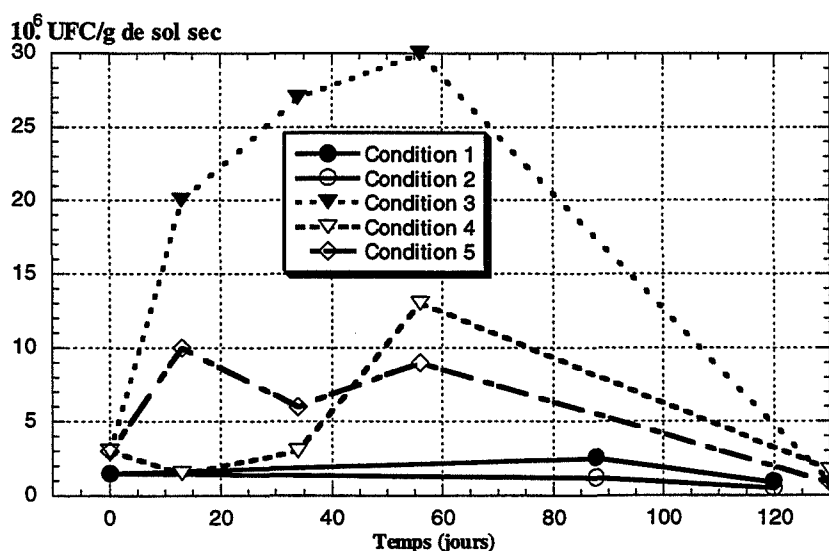
Ceci semble indiquer que la mesure de la quantité de ces micro-organismes n'est pas un très bon traceur de la biodégradation. En effet, les micro-organismes présents peuvent avoir un bon niveau de population sans dégrader les HAP, si les éléments nutritifs dont ils ont besoin sont présents en excès.

Les conditions 1 et 2 sont également quasiment identiques en ce qui concerne le nombre de champignons et levures dans les microcosmes de sol (Figure V.2.1-b). Cela peut être dû à la fois au pH et au % d'humidité (20%).

En effet, à 27% d'humidité (Série 2), cette population microbienne est bien plus élevée qu'à 20% (Série 1), ceci même en prenant en compte le fait que la population initiale est supérieure dans la 2<sup>ème</sup> série d'essais.

Cette population est plus faible dans les conditions 4 et 5, où le pH du sol a été ajusté à 5,3 : ce pH du sol ne favorise pas les populations fongiques bien que les pH optima des champignons et des levures soient plutôt acides.

Cette 2<sup>ème</sup> population microbienne n'est donc pas encore là un bon indicateur de l'activité de biodégradation dans le sol, pour la même raison que pour la population de bactéries et Actinomycètes.



**Figure V.2.1-b : Population microbienne (levures et champignons) des microcosmes de sol dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30%(w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30%(w/w) sciure.**

Ainsi, l'absence de population microbienne implique bien l'absence de biodégradation, mais la réciproque est fautive : ce ne sont pas les dénombrements les plus élevés qui mènent à la biodégradation la plus forte.

## V.2.2 – Dégradation globale des HAP

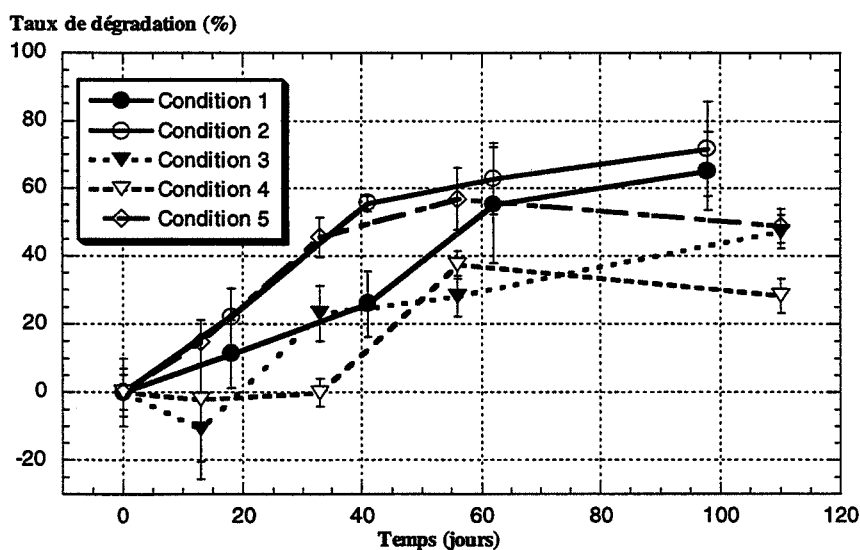
### V.2.2.1 – HAP totaux

A 20% d'humidité, nous constatons que l'addition de sciure à 30%(w/w) améliore la vitesse de disparition des HAP. Il semble toutefois que la teneur résiduelle en HAP totaux soit la même en présence de sciure ou non (Figure V.2.2.1-a). Après 100 jours d'incubation, 70% des HAP totaux ont disparu en présence de sciure, 65% en l'absence. Il semble qu'il n'y a pas modification de l'équilibre final en termes de HAP totaux : c'est la cinétique de disparition qui est différente. D'ailleurs, en termes des 16 HAP individuels, les teneurs à 100 jours sont identiques en présence ou non de sciure, comme nous le verrons au V.2.3.

La meilleure efficacité de la disparition des HAP (vitesse plus grande) est sans doute due à l'amélioration des échanges gazeux, et donc du métabolisme microbien aérobie, provoquée par l'aération du sol due à l'addition de sciure. Celle-ci limite en effet le phénomène de compactage, ainsi que l'évaporation. Dans l'échantillon sans sciure (condition 1), il est nécessaire de rajouter fréquemment de l'eau pour ajuster l'humidité à 20% et l'aération manuelle est indispensable pour empêcher le compactage du sol. La sciure joue donc un rôle d'aérateur.

Nous avons vu au V.2.1 que la population fongique du sol n'est pas augmentée en présence de sciure. L'égalité des teneurs en HAP à 100 jours confirme que la sciure n'apporte pas d'éléments extérieurs améliorant la biodégradation en termes de teneurs. S'il y avait eu apport de champignons filamenteux par la sciure, la teneur en HAP à 100 jours dans la condition 2 aurait dû être inférieure à celle de la condition 1 (l'équilibre aurait été modifié).

Or la teneur finale en HAP totaux est de 629,3 mg/kg dans la condition 1, et de 576,0 mg/kg dans la condition 2. Elles peuvent donc être considérées comme identiques en tenant compte de l'écart-type de 20%.



**Figure V.2.2.1-a :** Taux de dégradation (%) des HAP totaux dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30%(w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30%(w/w) sciure.

A 27% d'humidité (série 2), la teneur initiale en HAP totaux est de 1551 mg/kg, soit 80% de la teneur initiale de la série 1. Il y a donc eu une biodégradation partielle des HAP à +4°C. Il n'est donc pas possible de comparer directement les taux de dégradation avec l'essai précédent.

Toutefois, après 110 jours d'incubation à 27% d'humidité (condition 3), la teneur en HAP totaux du sol est de 820 mg/kg, la teneur initiale étant de 1551 mg/kg. A 20% d'humidité (condition 1), la teneur initiale en HAP totaux est de 1915 mg/kg et la teneur à 100 jours est de 629 mg/kg.

Il est donc cohérent de conclure de cette observation que la cinétique globale de biodégradation est plus lente dans le sol à 27% d'humidité par rapport au sol à 20%. Nous n'avons pas fait cette observation en utilisant la Figure V.2.2.1-a car les teneurs initiales en HAP des conditions 1 et 3 sont différentes. L'utilisation des taux de dégradation pour cette comparaison aurait donc pu fausser l'interprétation.

En effet, 20% et 27% d'humidité correspondent respectivement à 37% et 50% de la W.H.C.. Il est possible que l'augmentation correspondante de l'eau dans les pores rende les échanges gazeux difficiles. Si le mécanisme de biodégradation des HAP est aérobie, il est possible que l'activité métabolique des micro-organismes impliqués dans la biodégradation soit diminuée par l'augmentation de la quantité d'eau dans les pores du sol.

Donc, en termes de HAP totaux, la vitesse de biodégradation est plus élevée dans le sol à 20% d'humidité que dans celui à 27% d'humidité.

Comparons maintenant entre eux les résultats obtenus dans la 2<sup>ème</sup> série d'expérimentations (sol à 27% d'humidité).

La biodégradation dans la condition 4 (pH du sol égal à 5,3) est moins bonne que dans la condition 3 (pH du sol égal à 7,2). Un pH acide aurait dû favoriser les champignons et les levures par rapport aux bactéries. Cela n'a pas été le cas (en nombre, tout au moins), comme nous l'avons vu au V.2.1. Il est ici plus efficace de travailler à pH neutre (7,2) qu'acide (5,3).

La condition 5 correspond à un pH du sol ajusté à 5,3 en début d'expérimentation et à une addition de sciure de 30% (w/w). La biodégradation en termes de HAP totaux est plus rapide que dans les conditions 3 et 4. Mais la teneur à 110 jours est la même que dans la condition 3.

La teneur finale en HAP totaux est de 795 mg/kg dans la condition 5, contre 576 mg/kg dans la condition 2. Or la teneur initiale en HAP totaux est inférieure dans la condition 5 par rapport à la condition 2, le temps d'incubation étant lui supérieur. Aussi, il est donc possible de conclure que la biodégradation, en termes de HAP totaux, est meilleure dans la condition 2 que dans la condition 5. Nous n'avons pas fait cette observation en utilisant la Figure V.2.2.1-a car les teneurs initiales en HAP des conditions 2 et 5 sont différentes.

Nous pouvons donc écrire à partir des observations réalisées que :

A pH=7,2, la biodégradation à 20% d'humidité est supérieure à celle à 27%.

A 27% d'humidité, elle est meilleure à pH=7,2 qu'à pH=5,3.

L'addition de sciure, à pH=7,2 ou 5,3, améliore le processus de biodégradation.

La meilleure condition de dégradation en termes de HAP totaux, parmi celles étudiées, est la condition 2, c'est-à-dire 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) de sciure.



### V.2.2.2 – HAP cancérigènes

Les teneurs initiales en HAP cancérigènes sont de  $550 \pm 50$  mg/kg dans la série 1 et de  $650 \pm 100$  mg/kg dans la série 2. Elles sont donc tout à fait similaires en tenant compte de l'écart-type.

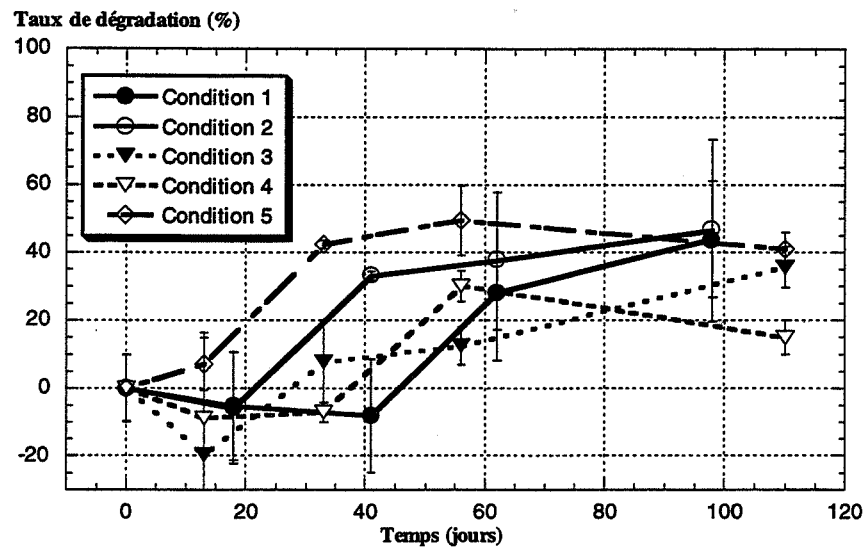


Figure V.2.2.2-a : Taux de dégradation (%) des HAP cancérigènes dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30%(w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30%(w/w) sciure.

Comme précédemment, la vitesse de dégradation des HAP cancérigènes est plus grande dans la condition 2 par rapport à la condition 1 (Figure V.2.2.2-a), mais la teneur à 100 jours est la même,  $305 \pm 100$  mg/kg.

Le taux de dégradation atteint après 100 jours d'incubation à 23°C est égal à 45-50%. Il est donc inférieur à celui observé pour les HAP totaux. Ceci n'est pas étonnant car les HAP cancérigènes sont plus gros (plus de cycles, donc plus stables) que les autres.

La teneur en HAP cancérigènes à 110 jours dans la condition 3 ( $418 \pm 40$  mg/kg) est supérieure à celle de la condition 1 ( $305 \pm 100$  mg/kg). La biodégradation est donc plus efficace à 20% qu'à 27% d'humidité pour les HAP cancérigènes.

De même qu'au V.2.2.1, la biodégradation est meilleure dans la condition 5 que dans la 3, que dans la 4.

Les conclusions sont donc les mêmes pour les HAP totaux et les HAP cancérigènes.

### V.2.2.3 – Bilan

Il existe donc une biodégradation naturelle des HAP (cancérigènes ou non) dans le sol prélevé.

Cette biodégradation est meilleure pour les HAP totaux que pour les HAP cancérigènes. Les HAP cancérigènes sont en effet tous constitués de plus de 4 cycles aromatiques, alors que les autres ont majoritairement seulement 2, 3 et 4 cycles (9 sur 10 d'entre eux). Ils sont donc plus stables et moins biodégradables.

Nous avons vu que la meilleure biodégradation globale des HAP totaux et cancérigènes à 23°C a lieu (parmi les conditions testées) à 20% d'humidité du sol, i.e. 37% de la W.H.C., avec un pH du sol de 7,2 et une addition de sciure de 30% en masse.

Nous n'avons pas pu faire d'étude en fonction de la quantité de sciure additionnée par manque de cette sciure.

La biodégradation est moins bonne à 27% d'humidité avec un pH de 7,2, et encore moins à 27% d'humidité avec un pH de 5,3.

En résumé, nous pouvons écrire en termes de HAP totaux et cancérigènes :

**Condition 2 > Condition 1 > Condition 5 > Condition 3 > Condition 4**

Toutefois, ces indications sont globales. Il est intéressant pour nous de connaître le « comportement » des 16 HAP cibles individuellement.

### V.2.3 – Dégradation par famille de HAP

En étudiant de manière plus détaillée les teneurs en les 16 HAP cibles individuels des microcosmes de sol utilisés, nous nous sommes aperçu que des recoupements par nombre de cycles pouvaient être réalisés.

Nous avons regroupé le naphthalène (2 cycles), avec l'acénaphthène et l'acénaphthylène (3 cycles) car leurs comportements sont similaires, comme nous le verrons dans la suite. Quand nous évoquerons les HAP de 3 cycles, il s'agira de fluorène, phénanthrène et anthracène.

#### V.2.3.1 – Naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène

Dans la 1<sup>ère</sup> série d'essais, la teneur initiale en naphthalène est de 32,5 mg/kg alors que l'acénaphthylène et l'acénaphthène ne sont pas détectés. Dans la 2<sup>ème</sup> série, les teneurs initiales en naphthalène et en acénaphthylène sont de 6,7 et 40,2 mg/kg respectivement, l'acénaphthène n'étant toujours pas détecté (Tableau V.2.3.1-a).

Teneurs (mg/kg de sol sec)	Série 1	Série 2
<b>Naphthalène</b>	32,5	6,7
<b>Acénaphthylène</b>	ND	40,2
<b>Acénaphthène</b>	ND	ND

**Tableau V.2.3.1-a :** Teneurs initiales (en mg/kg de sol sec) en **naphthalène, acénaphthylène et acénaphthène** dans les 2 séries d'expériences décrites (Séries 1 et 2). ND : non détectable.

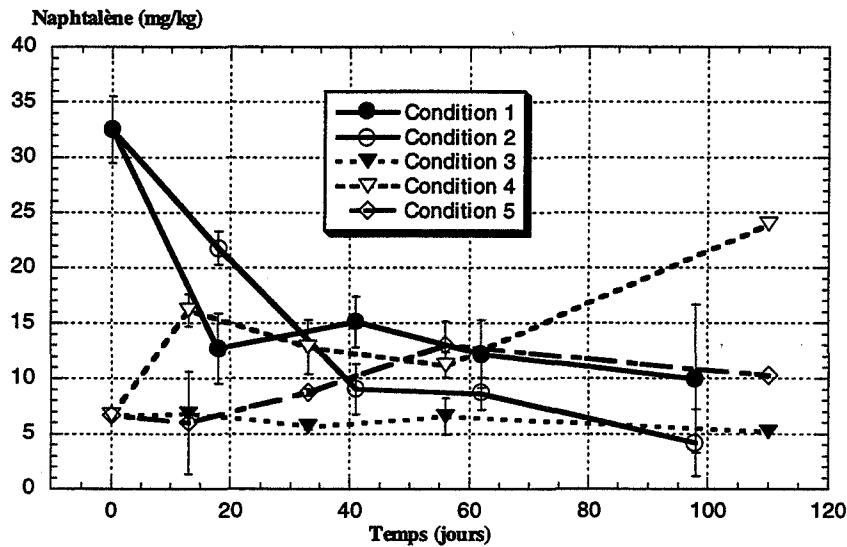
Nous avons vu au Tableau V.2-a qu'il y a diminution des teneurs initiales du sol en certains HAP de 3 et 4 cycles dans la Série 2 par rapport à la Série 1. Il est donc tentant de supposer que ces HAP se sont dégradés en acénaphthylène, notamment, pendant le laps de temps séparant la mise en route des 2 séries d'expériences.

Cette explication serait intéressante car elle impliquerait que la biodégradation naturelle des HAP de 3 et 4 cycles serait réalisée séquentiellement en produisant des HAP plus petits donc plus aisément biodégradables jusqu'à la minéralisation.

Mais, si cela était le cas, nous devrions observer une accumulation d'acénaphthylène en fonction du temps dans les conditions 1 et 2 (série 1), qui correspondrait à la biodégradation des HAP de 3 et 4 cycles. Or cela n'est pas le cas.

D'autres composés que les 16 HAP considérés dans cette étude sont présents dans le sol pollué utilisé. Il est plus vraisemblable que l'acénaphthylène accumulé dans l'échantillon conservé provienne de leur dégradation (qui n'est pas nécessairement une biodégradation) due à la conservation à +4°C. N'étant pas dans les mêmes conditions (température, aération) dans nos essais de biodégradation de la Série 1, les phénomènes ayant lieu à 4°C sont différents et les observations différentes.

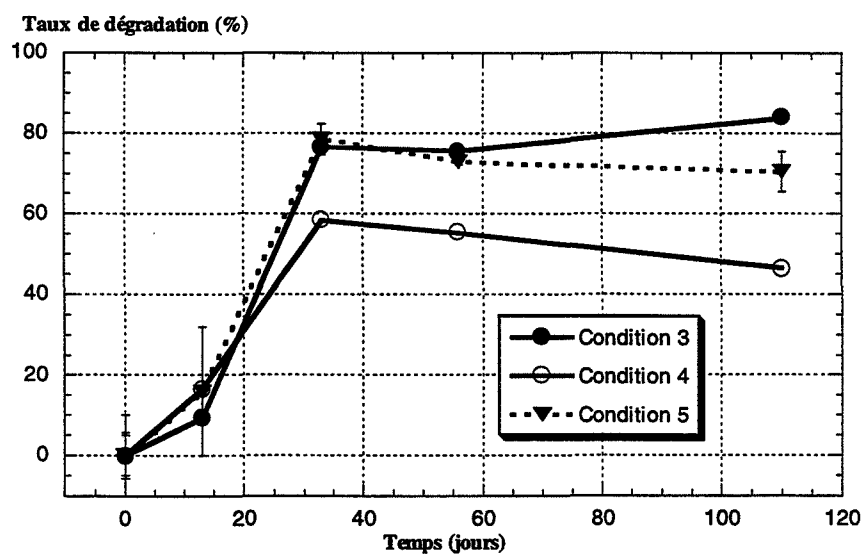
La teneur initiale en naphthalène dans la série 2 est égale à la teneur finale dans la condition 2. Aussi, les profils de dégradation sont différents entre les 2 séries d'essais, et ne sont pas comparables entre séries.



**Figure V.2.3.1-a :** Teneur (en mg/kg de sol sec) en naphthalène des microcosmes de sol dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30%(w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

Dans la 1<sup>ère</sup> série, la présence de sciure (condition 2) améliore la dégradation du naphthalène : la dégradation est plus lente au départ que dans la condition 1, mais plus efficace après 100 jours d'incubation (Figure V.2.3.1-a).

Dans la 2<sup>ème</sup> série d'essais (Figure V.2.3.1-a), la teneur en naphthalène est constante (condition 3) ou augmente pendant l'incubation (conditions 4 et 5). Il peut exister une accumulation de naphthalène due à la dégradation des HAP de poids moléculaire plus élevé ou d'autres composés présents dans le sol pollué et non étudiés ici.



**Figure V.2.3.1-b :** Taux de dégradation (%) de l'acénaphthylène dans les conditions 3 à 5. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

En ce qui concerne l'acénaphylène, une biodégradation est mise en évidence dans la 2<sup>ème</sup> série d'essais. Elle atteint 90% dans la condition 3. Elle est meilleure dans la condition 3 que la condition 5, que la condition 4 (Figure V.2.3.1-b).

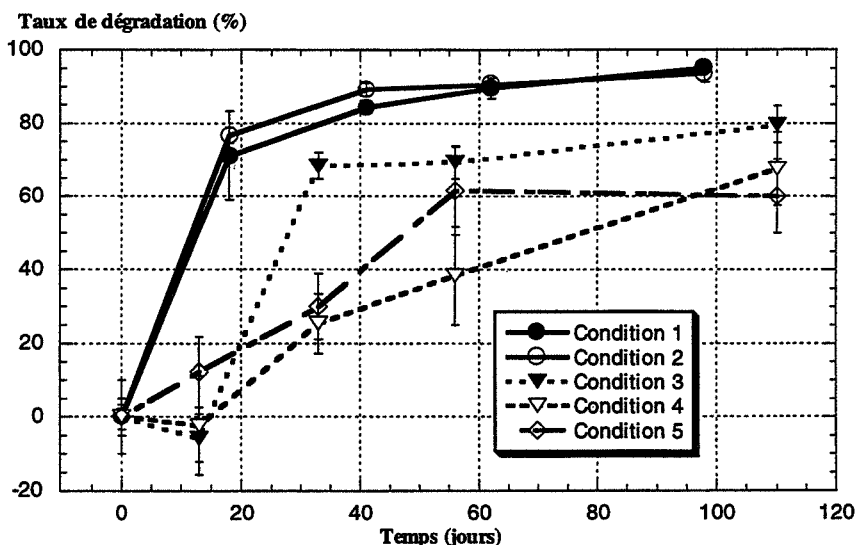
L'acénaphène n'est détecté initialement dans aucun échantillon, mais il apparaît après 56 jours d'incubation dans la condition 3 à 1,38 mg/kg. Après 110 jours d'incubation, il est présent dans tous les microcosmes de la 2<sup>ème</sup> série d'essais, à des concentrations de 4,86, 16,26 et 4,43 mg/kg pour les conditions 3, 4 et 5 respectivement. Comme pour le naphtalène, il peut s'agir d'une accumulation due à la dégradation des HAP de poids moléculaire plus élevé ou d'autres composés présents dans le sol pollué et non étudiés ici.

Que ce soit pour le naphtalène et l'acénaphène, il est en fait peu probable que leur accumulation dans les microcosmes de sol soit due à la dégradation des HAP (parmi les 16 étudiés) de plus fort poids moléculaire. En effet, les produits de dégradation du métabolisme microbien des HAP que nous avons évoqués au III.5.3 ne sont pas des HAP de poids moléculaire plus faible, mais plutôt des produits hydroxylés, oxydés, ... Les cycles sont généralement cassés (pas tous), mais des fonctions (-OH, =O, -COOH, -CHO, ...) se rajoutent et on n'obtient pas des « vrais » HAP.

#### V.2.3.2 – 3 cycles : fluorène, phénanthrène, anthracène

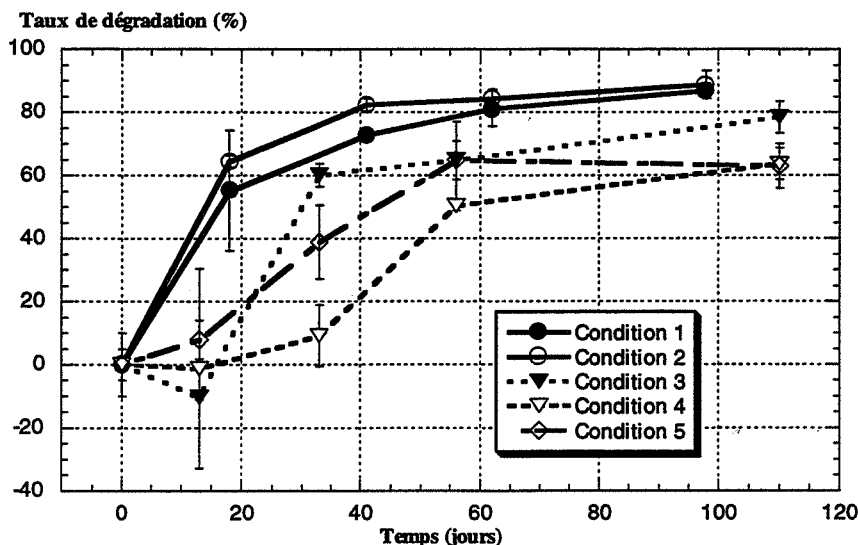
Les Figures V.2.3.2-a, -b et -c représentent les taux de dégradation du fluorène, du phénanthrène et de l'anthracène dans les conditions 1 à 5.

Dans la 1<sup>ère</sup> série d'expériences, nous voyons que le fluorène est dégradé à 95%, le phénanthrène et l'anthracène à 85-90%.



**Figure V.2.3.2-a :** Taux de dégradation (%) du fluorène dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

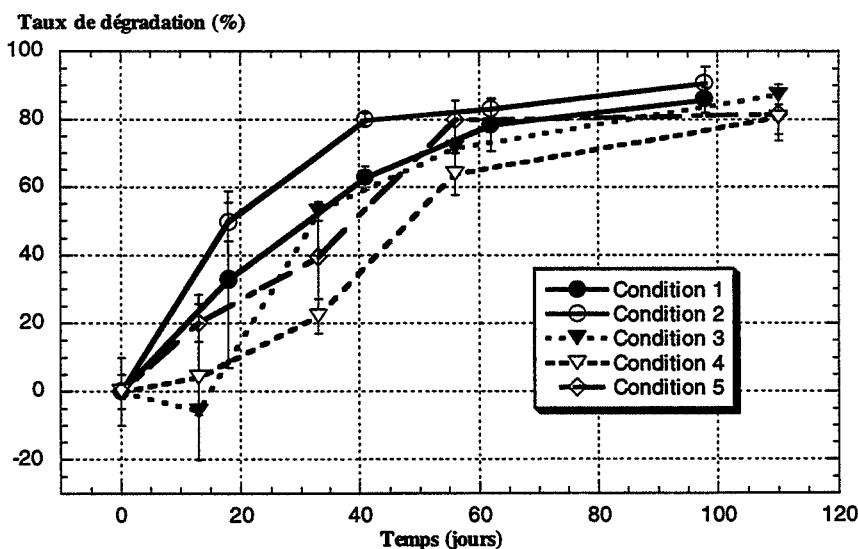
La dégradation de ces trois composés est plus rapide en présence de 30% de sciure (condition 2), mais le taux de dégradation à 100 jours, et donc la teneur en ces HAP, sont les mêmes dans les deux conditions. A 20% d'humidité, l'équilibre final est donc identique : la sciure sert d'accélérateur, mais n'améliore pas la biodégradation naturelle de ces trois composés en termes de teneur finale du sol. Nous dirons donc que **condition 2 > condition 1**, puisque le phénomène est accéléré.



**Figure V.2.3.2-b :** Taux de dégradation (%) du **phénanthrène** dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

En ce qui concerne la 2<sup>ème</sup> série d'essais, les profils de dégradation dans la condition 3 (27% d'humidité, pH=7,2) sont similaires pour les trois HAP évoqués ici. Les taux de dégradation du fluorène et du phénanthrène atteignent 80% à 110 jours et 85-90% pour l'anthracène. Le démarrage de la biodégradation semble plus lent que dans la condition 1 à 20% d'humidité, mais cela peut être un artefact dû à l'écart-type (10%) à 15 jours.

L'ajustement du pH du sol à 5,3 (condition 4) ralentit la biodégradation des 3 HAP, surtout celles du fluorène et du phénanthrène, mais l'étendue de la dégradation tend vers celle de la condition 3 avec le temps. Il s'agit là d'une diminution de la vitesse de dégradation due à la baisse de pH, l'équilibre final étant presque identique.



**Figure V.2.3.2-c :** Taux de dégradation (%) de l'**anthracène** dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

Nous pouvons donc écrire **condition 3 > condition 4**. Cette baisse du pH était censée stimuler la population fongique pour améliorer la biodégradation. Il semble qu'elle ait plutôt inhibé l'activité de la population bactérienne.

La biodégradation des HAP de 3 cycles est plus lente dans la condition 5 (pH=5,3, 30% sciure) que dans la condition 3 (pH=7,2), mais plus rapide que dans la condition 4 (pH=5,3). L'équilibre final semble presque le même. L'addition de sciure compense donc partiellement les effets négatifs de la baisse du pH sur les micro-organismes en améliorant les échanges gazeux.

Donc pour les HAP de 3 cycles, l'addition de sciure accélère le processus de biodégradation alors que la baisse du pH le ralentit.

En ce qui concerne l'influence de l'humidité du sol sur la biodégradation, nous devons rester prudents quand nous comparons les taux de dégradation des conditions 1 et 3 car les teneurs initiales en HAP sont très différentes (Tableau V.2.3.2-a).

Si nous nous référons aux Figures V.2.3.2-a et V.2.3.2-b pour le fluorène et le phénanthrène respectivement, nous relevons respectivement 95% et 90% de dégradation à 100 jours d'incubation dans la condition 1. Dans la condition 3, la dégradation du fluorène et du phénanthrène est de 80% à 110 jours. Cela correspond à des teneurs finales dans les microcosmes de sol équivalentes dans les 2 conditions. Les courbes de la condition 3 atteignent un plateau après les courbes de la condition 1. Comme les teneurs initiales en fluorène et phénanthrène sont supérieures dans la condition 1, nous pouvons dire que leur biodégradation est plus rapide à 20% d'humidité qu'à 27%.

Pour l'anthracène (Figure V.2.3.2-c), nous concluons plutôt que la différence d'humidité n'a pas d'influence sur la biodégradation (les courbes se superposent et les teneurs à 100 jours sont similaires).

Teneur en mg/kg	Condition 1 (Série 1)	Condition 3 (Série 2)
Fluorène	146,5	38,5
Phénanthrène	296,0	97,7
Anthracène	163,3	63,1

**Tableau V.2.3.2-a : Teneurs initiales (en mg/kg de sol sec) en HAP de 3 cycles.**

Nous resterons toutefois prudents sur cette interprétation de l'effet de l'humidité du sol.

Donc, pour le fluorène, le phénanthrène et l'anthracène, dans les 5 conditions étudiées, l'équilibre final atteint est presque le même, mais les modifications de pH et l'addition de sciure affectent la vitesse à laquelle l'équilibre est atteint.

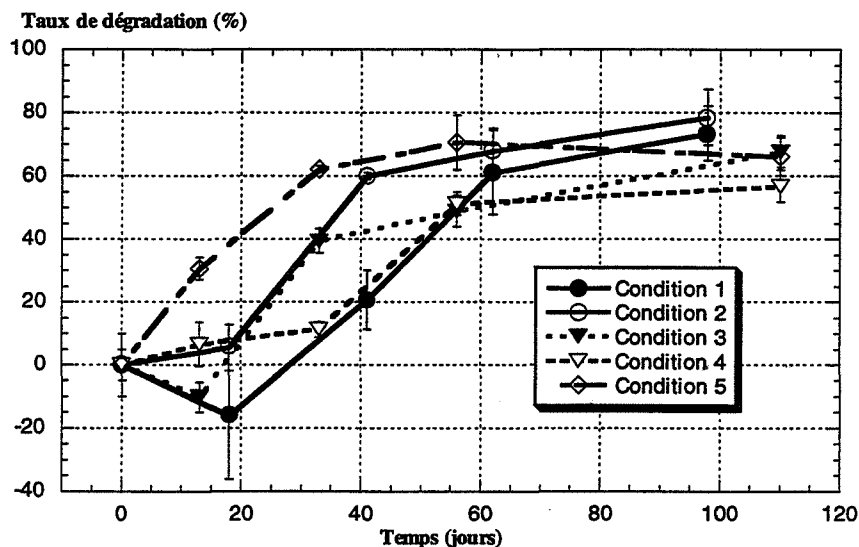
Nous pouvons écrire :

**pH=7,2 > pH=5,3,  
20% d'humidité > 27% d'humidité,  
addition de sciure > sans sciure.**

V.2.3.3 – 4 cycles : fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène

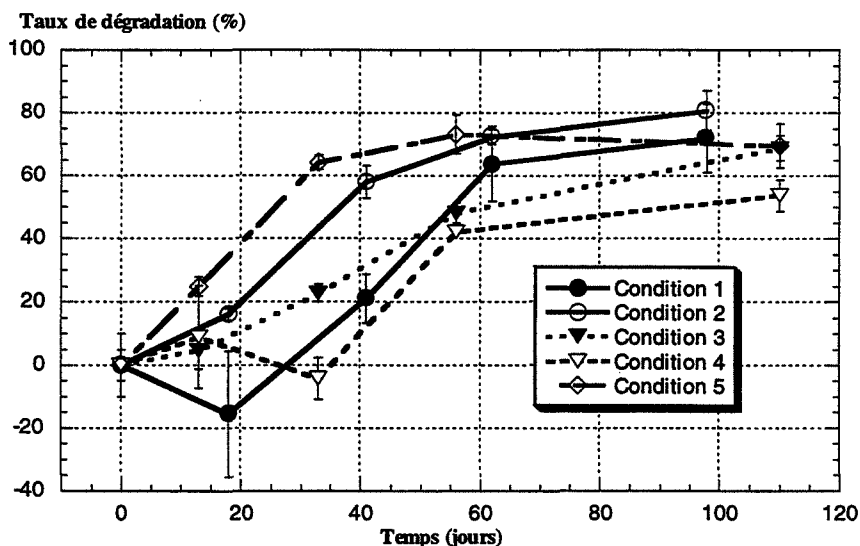
Notons que le benzo(a)anthracène et le chrysène font partie des HAP suspectés d'être cancérigènes.

Les Figures V.2.3.3-a, -b, -c et -d représentent le taux de dégradation du fluoranthène, du pyrène, du benzo(a)anthracène et du chrysène dans les conditions 1 à 5.



**Figure V.2.3.3-a :** Taux de dégradation (%) du **fluoranthène** dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

Dans la 1<sup>ère</sup> série d'essais, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène sont dégradés à 80%, alors que le taux de dégradation atteint pour le chrysène est de 60% en fin d'incubation.

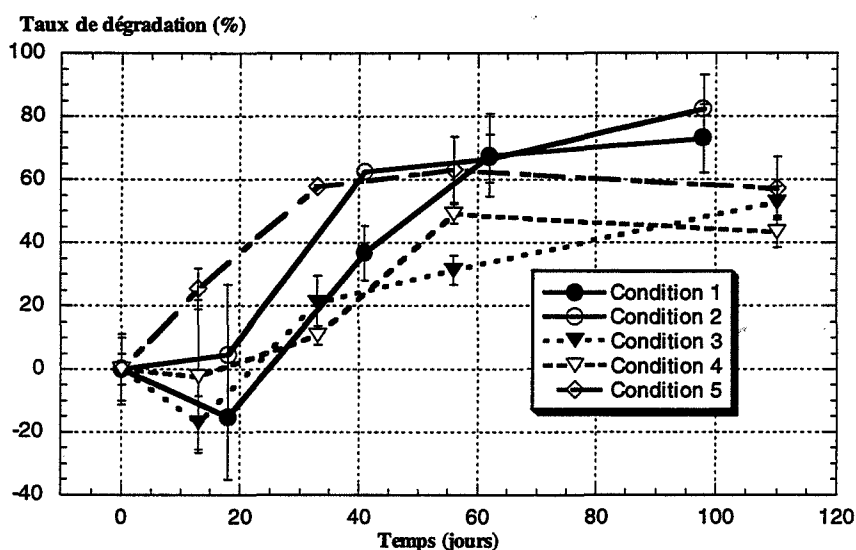


**Figure V.2.3.3-b :** Taux de dégradation (%) du **pyrène** dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

Comme précédemment au V.2.3.2, la disparition du fluoranthène, du pyrène et du benzo(a)anthracène est plus rapide en présence de sciure (condition 2). Ce n'est pas le cas du

chrysène pour lequel l'apport de sciure n'améliore pas la cinétique de dégradation. L'équilibre à atteindre semble presque le même pour les deux conditions d'incubation.

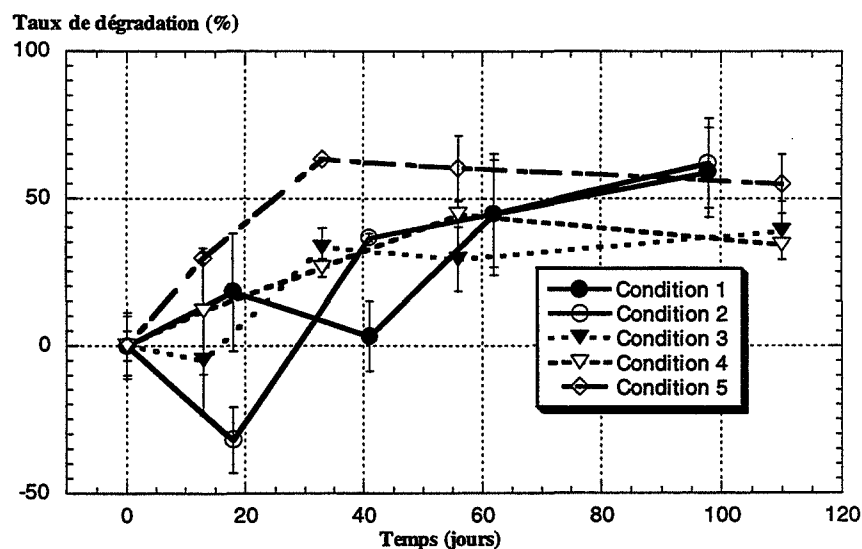
Donc, pour les HAP de 4 cycles, nous pouvons écrire **condition 2 > condition 1**.



**Figure V.2.3.3-c :** Taux de dégradation (%) du **benzo(a)anthracène** dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

En ce qui concerne la 2<sup>ème</sup> série d'essais (conditions 3, 4 et 5), les observations que nous pouvons faire sont différentes de celles que nous avons faites au V.2.3.2 pour les HAP de 3 cycles.

Pour le fluoranthène et le pyrène, la biodégradation est un peu plus rapide à pH=7,2 (condition 3) qu'à pH=5,3 (condition 4). A 110 jours d'incubation, le taux de dégradation (en moyenne) est de 70% à pH=7,2 contre 55% à pH=5,3 pour ces 2 HAP. Si nous considérons les écarts-types, ces taux finaux peuvent même être considérés égaux (Figures V.2.3.3-a et V.2.3.3-b).



**Figure V.2.3.3-d :** Taux de dégradation (%) du **chrysène** dans les conditions 1 à 5. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.



Les mêmes remarques peuvent être faites pour le benzo(a)anthracène et le chrysène, en tenant compte des fluctuations et des écarts-type aux Figures V.2.3.3-c et V.2.3.3-d.

Les courbes obtenues pour les 4 HAP de 4 cycles sont globalement très similaires, en prenant en compte les écarts-types.

Enfin, la condition 5 (pH=5,3, 30% (w/w) de sciure) améliore nettement la vitesse de disparition de ces 4 HAP à 4 cycles. Le taux de dégradation à 110 jours est le même que dans la condition 3, sauf pour le chrysène où il est de 55% au lieu de 40% (donc augmenté).

Pour les HAP de 4 cycles, il est donc possible d'écrire :

**Condition 5 > condition 3 > condition 4**

Les teneurs initiales en HAP de 4 cycles sont données dans le Tableau V.2.3.3-a. Etant donné les écarts-types mesurés, les teneurs en ces 4 HAP peuvent être considérées comme similaires dans les séries 1 et 2. La comparaison des taux de dégradation mesurés dans les conditions 1 et 3 peut donc sans doute être faite directement.

Teneur en mg/kg	Condition 1 (Série 1)		Condition 3 (Série 2)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Fluoranthène	374,7	22,9	293,0	13,1
Pyrène	271,0	24,7	202,4	10,2
Benzo(a)anthracène	201,9	5,2	145,1	12,1
Chrysène	123,2	2,9	141,7	15,3

**Tableau V.2.3.3-a : Teneurs initiales (en mg/kg de sol sec) en HAP de 4 cycles.**

Aussi, si nous nous référons aux Figures V.2.3.2-a, -b, -c et -d pour les taux de dégradation du fluoranthène, du pyrène, du benzo(a)anthracène et du chrysène, il n'est pas réellement possible de différencier les courbes des taux de dégradation en fonction du temps pour les conditions 1 et 3 du fait des écarts-types importants.

Il semblerait donc que la dégradation des HAP de 4 cycles soit similaire à 20% et 27% d'humidité.

En conclusion pour les HAP de 4 cycles, il est possible d'écrire que :

- l'addition de sciure accélère la biodégradation,
- la biodégradation est identique à 20% et à 27% d'humidité du sol,
- la biodégradation est plus rapide à pH=7,2 qu'à pH=5,3,
- la baisse du pH à 5,3 combinée à l'addition de sciure accélère la biodégradation par rapport à celle à pH=7,2, et augmente même le taux de dégradation du chrysène.

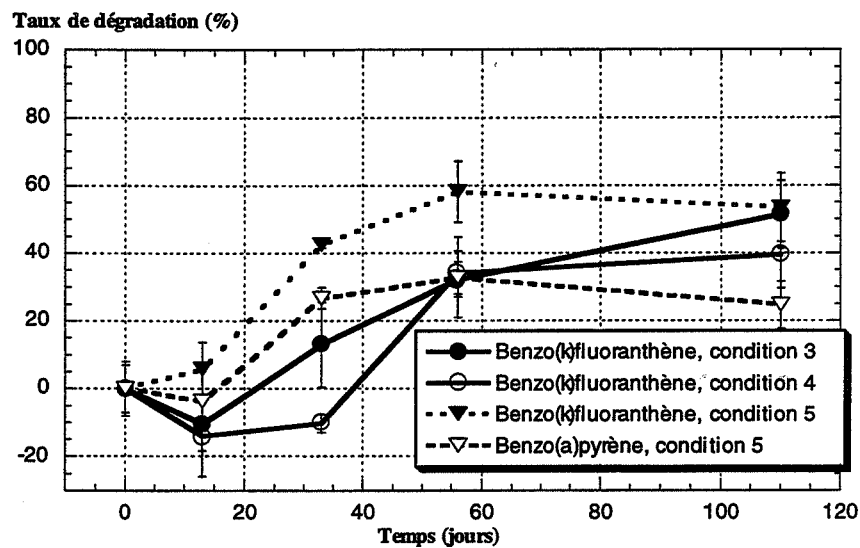
**V.2.3.4 – 5 cycles :** benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène

Parmi ces 4 HAP, les trois premiers sont suspectés être cancérigènes.

Dans la 1<sup>ère</sup> série d'expériences, en tenant compte des écarts-types, il n'y a pas de dégradation des HAP de 5 cycles dans les conditions 1 et 2 (20% d'humidité, pH=7,2, sans et avec 30% (w/w) de sciure).

Dans la 2<sup>ème</sup> série d'essais, aucune biodégradation n'est mise en évidence dans les conditions 3, 4 et 5 sur le benzo(b)fluoranthène et le dibenzo(a,h)anthracène. Par contre, le

benzo(k)fluoranthène est dégradé dans les conditions 3, 4, et 5, le benzo(a)pyrène dans la condition 5 (Figure V.2.3.4-a).



**Figure V.2.3.4-a :** Taux de dégradation (%) du **benzo(k)fluoranthène** dans les conditions 3 à 5 et du **benzo(a)pyrène** dans la condition 5. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30%(w/w) sciure.

Les taux de dégradation du benzo(k)fluoranthène et du benzo(a)pyrène dans la condition 5 sont de 50% et 25% respectivement à 110 jours d'incubation. Cela correspond à des teneurs de 34,8 mg/kg et 75,0 mg/kg, qui sont voisines des teneurs initiales de la série 1 (Tableau V.2.3.4-a). Cela explique sans doute pourquoi aucune biodégradation n'a été observée dans les conditions 1 et 2. Ces teneurs sont sans doute les minima possibles dans la configuration du sol.

Teneur en mg/kg	Condition 1 (Série 1)		Condition 3 (Série 2)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
<b>Benzo(b)fluoranthène</b>	79,9	5,4	118,2	25,0
<b>Benzo(k)fluoranthène</b>	40,3	5,4	71,6	7,4
<b>Benzo(a)pyrène</b>	78,1	5,0	100,1	10,1
<b>Dibenzo(a,h)anthracène</b>	22,8	1,8	79,0	5,1

**Tableau V.2.3.4-a :** Teneurs initiales (en mg/kg de sol sec) en HAP de 5 cycles.

Nous constatons au Tableau V.2.3.4-a que les teneurs initiales en HAP de 5 cycles de la Série 2 sont supérieures à celles de la Série 1. Pour le benzo(b)fluoranthène et le benzo(a)pyrène, compte tenu des écarts-types, les teneurs initiales sont sensiblement égales dans chaque série.

Pour le dibenzo(a,h)anthracène, la teneur initiale dans la Série 2 est d'environ 3 fois celle de la Série 1. Or, ce composé est difficilement détecté par notre méthode d'analyse (CLHP avec détecteur UV-visible à barrette de diodes). Le pic d'éluion du dibenzo(a,h)anthracène est d'intensité assez faible sur nos chromatogrammes et n'est pas pur. Sa quantification est donc faussée par des impuretés dans les extraits de sol. En outre, nous devons intégrer manuellement le pic correspondant, et de petites variations sur l'intégration modifient beaucoup la quantification. Cela peut expliquer les écarts importants observés au Tableau V.2.3.4-a.

La baisse du pH du sol de 7,2 à 5,3 diminue la biodégradation du benzo(k)fluoranthène de 50% à 40%, et l'addition de sciure au sol de pH=5,3 (condition 5) la ramène à 50%. La sciure compense donc l'effet négatif de la diminution du pH.

En ce qui concerne le benzo(a)pyrène, seul le microcosme à 27% d'humidité, pH=5,3 et contenant de la sciure donne lieu à une biodégradation de l'ordre de 25%.

Nous n'avons donc observé de biodégradation que pour le benzo(k)fluoranthène et le benzo(a)pyrène parmi les 4 HAP de 5 cycles. Toutefois, celle-ci est plutôt faible et semble stopper lorsque la teneur du sol en benzo(k)fluoranthène et en benzo(a)pyrène est de l'ordre de 40 mg/kg et 75 mg/kg respectivement. Ces teneurs ne sont pas négligeables ; elles sont plus élevées que certaines limites observées précédemment pour les HAP de 3 et 4 cycles, alors que ces HAP à 5 cycles sont potentiellement plus dangereux.

L'addition de sciure est le facteur qui permet la meilleure biodégradation.

#### V.2.3.5 – 6 cycles : benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

L'indéno(1,2,3-cd)pyrène est suspecté être cancérigène.

Aucune biodégradation de ces 2 HAP n'est observée dans les conditions 1 et 2, les teneurs initiales en benzo(g,h,i)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène étant de 50,1 mg/kg et 34,9 mg/kg respectivement.

Dans la 2<sup>ème</sup> série d'essais, la teneur initiale est de 80,7 mg/kg et 73,2 mg/kg respectivement. Aucune diminution de la teneur en benzo(g,h,i)pérylène n'est observée, alors que la teneur en indéno(1,2,3-cd)pyrène est de 43,9 mg/kg, 55,5 mg/kg et 42,0 mg/kg dans les conditions 3, 4 et 5 respectivement après 110 jours d'incubation (Figure V.2.3.5-a). Cela correspond à environ 50% de dégradation.

Peut-être que 34,9 mg/kg est une valeur inférieure limite atteignable (valeur d'équilibre) par les micro-organismes dégradateurs dans notre cas. Cela expliquerait pourquoi aucune biodégradation n'a été mesurée dans la 1<sup>ère</sup> série d'essais.

Il y a peu de différence entre les conditions 3 et 4 (pH=7,2 et pH=5,3), par contre l'addition de sciure (condition 5) favorise la biodégradation par rapport à la dégradation dans la condition 4.

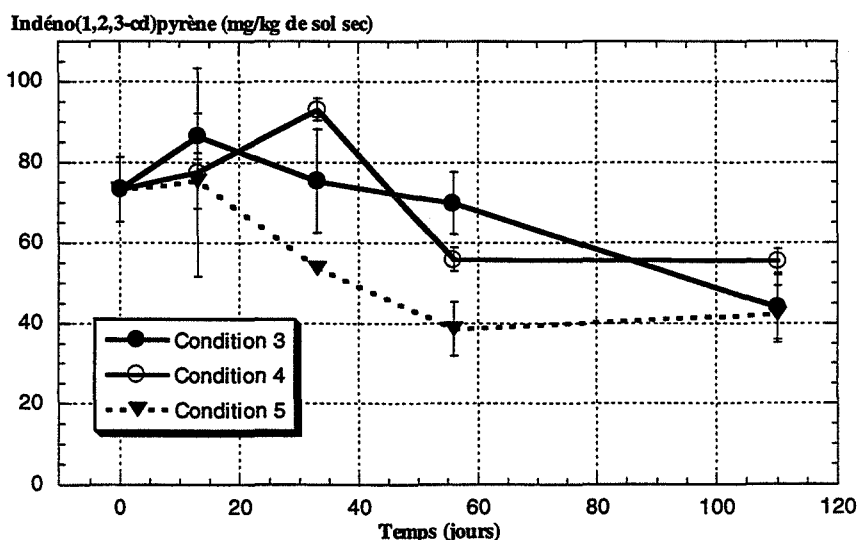


Figure V.2.3.5-a : Teneurs en indéno(1,2,3-cd)pyrène (en mg/kg de sol sec) des microcosmes de sol dans les conditions 3 à 5. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

Il est donc possible de mettre en évidence la biodégradation naturelle d'un HAP de 6 cycles, l'indéno(1,2,3-cd)pyrène. La baisse du pH de 7,2 à 5,3 influence peu la biodégradation, mais l'addition de sciure l'accélère de manière notable. La teneur résiduelle en ce HAP semble être d'environ 35 mg/kg pour le sol que nous étudions. Ceci est notable car ce HAP fait partie de ceux suspectés d'être cancérogènes.

Nous retrouvons donc la conclusion faite pour les HAP de 5 cycles.

#### V.2.4 – Calcul des demi-vies

Le calcul des demi-vies réalisé ici sous-entend que la teneur résiduelle en tous les HAP est nulle : nous les avons calculées en prenant le temps d'incubation qui correspond à une dégradation de 50% par rapport à la teneur initiale.

Normalement, c'est le temps auquel la teneur est égale à la différence entre la teneur initiale et la teneur à l'équilibre, divisée par 2. Or nous ne connaissons pas la teneur en HAP du sol à l'équilibre.

Les valeurs que nous donnons dans la suite servent donc en fait d'indicateur de la rapidité du processus de biodégradation.

		Demi-vies en jours				
		Série 1		Série 2		
		Cond. 1	Cond. 2	Cond. 3	Cond. 4	Cond. 5
2 cycles	Naphtalène	15	30	N.C.	N.C.	N.C.
3 cycles	Acénaphthylène	N.C.	N.C.	26	30	26
	Acénaphthène	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Fluorène	14	12	28	80	48
	Phénanthrène	17	14	30	57	42
	Anthracène	30	18	32	50	40
4 cycles	Fluoranthène	56	37	56	56	25
	Pyrène	55	36	62	92	25
	Benzo(a)anthracène*	49	36	102	56	28
	Chrysène*	77	72	> 110	> 110	25
5 cycles	Benzo(b)fluoranthène*	> 98	> 98	> 110	> 110	> 110
	Benzo(k)fluoranthène*	> 98	> 98	110	> 110	45
	Benzo(a)pyrène*	> 98	> 98	> 110	> 110	> 110
	Dibenzo(a,h)anthracène	> 98	> 98	> 110	> 110	> 110
6 cycles	Benzo(g,h,i)pérylène	> 98	> 98	> 110	> 110	> 110
	Indéno(1,2,3-cd)pyrène*	> 98	> 98	> 110	> 110	55

**Tableau V.2.4-a : Demi-vies des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. dans le sol prélevé dans les 5 conditions étudiées. Série 1 = condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2 ; condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure. Série 2 = condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2 ; condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3 ; condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure. N.C. = Non calculable. \* : HAP suspectés d'être cancérogènes.**

L'addition de sciure (condition 2) accélère la biodégradation des HAP jusqu'au chrysène, sauf pour le naphtalène pour lequel la biodégradation est plus lente au départ mais plus efficace en fin d'incubation. Nous évoquons l'accélération car la teneur à 100 jours est la même dans les conditions 1 et 2 : l'équilibre est sans doute proche, s'il n'est pas déjà atteint. Les demi-vies des HAP augmentent avec leur nombre de cycles (Tableau V.2.4-a).

Pour les HAP de 3 cycles, le fluorène et le phénanthrène sont dégradés environ à la même vitesse, la dégradation de l'anthracène étant plus lente.

De même pour les HAP à 4 cycles, le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène ont des profils semblables alors que le chrysène est plus résistant.

Pour les HAP à 5 et 6 cycles, aucune biodégradation n'a été mise en évidence dans la 1<sup>re</sup> série d'essais. Nous avons vu qu'il peut s'agir d'un problème d'équilibre (déjà atteint) pour le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène.

Dans la 2<sup>ème</sup> série d'essais, les demi-vies les plus basses sont dans la condition 3 pour les HAP de 3 cycles. Pour les HAP de 4, 5, et même 6 cycles, elles sont les meilleures dans la condition 5. Elles sont mêmes meilleures que dans la condition 2 pour les HAP de 4 cycles. Par contre, elles sont sensiblement multipliées par 4 pour les HAP de 3 cycles par rapport à la condition 2.

Pour les HAP de 5 et 6 cycles, nous ne pouvons pas dire que le résultat est meilleur que dans les conditions 1 et 2 car les teneurs finales de la série 2 sont égales aux teneurs initiales de la série 1.

En conclusion, l'addition de sciure dans les microcosmes de sol permet de diminuer significativement les demi-vies des HAP dans le sol. Elle agit sans doute en diminuant la compacité du sol et non par l'apport de micro-organismes exogènes ayant de larges capacités de dégradation. Son addition a pour effet d'augmenter les échanges gazeux et donc l'activité microbienne.

A pH=7,2 (série 1), les diminutions sont de 12 jours, 19 jours, 19 jours, 13 jours et 5 jours pour l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)anthracène et le chrysène respectivement (Tableau V.2.4-a).

A pH=5,3, (série 2, conditions 4 et 5), la diminution est de 32 jours pour le fluorène, 15 jours pour le phénanthrène, 10 jours pour l'anthracène, 31 jours pour le fluoranthène, 67 jours pour le pyrène, 28 jours pour le benzo(a)anthracène, plus de 85 jours pour le chrysène, plus de 55 jours pour l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (Tableau V.2.4-a).

### **V.3 – Effet de la température sur la biodégradation naturelle en microcosmes de sol**

Nous avons également suivi la teneur en les 16 HAP cibles dans des microcosmes de sol incubés à deux températures différentes : 23°C, comme précédemment, et 30°C. Il est connu qu'une différence de température, ici 7°C, peut affecter de manière importante l'activité microbienne.

Nous distinguons cette étude de celle menée au V.2 car nous avons là utilisé un échantillon de sol d'un autre prélèvement sur le site. Le sol utilisé cette fois a été prélevé 1 an après le premier prélèvement, toujours sur le même site.

Aussi, sa pollution par les 16 HAP est différente du V.2, à la fois en termes de teneurs et en termes de proportions relatives entre HAP. Le Tableau V.3-a présente les résultats de la mesure des teneurs en HAP au début de l'expérience.

La teneur en HAP totaux reste élevée. Le processus de biorémédiation sur site a sans doute un problème, mais cela nous permet de poursuivre nos expériences avec ce nouvel échantillon.

Nous constatons qu'il y a eu apparition d'acénaphthylène, comme nous l'avons observé au V.2 dans le prélèvement conservé à +4°C, mais aussi d'acénaphthène. Ils semblent apparaître dans le processus de biodégradation comme produits de la dégradation de composés de plus forts poids moléculaires. Il y a donc accumulation d'acénaphthylène et d'acénaphthène dans un premier temps. Puis leur teneur dans le sol diminue car ils sont eux-mêmes biodégradés.

	Teneur en mg/kg	Ecart-type
<b>Naphtalène</b>	28,2	3,9
<b>Acénaphthylène</b>	33,4	7,8
<b>Acénaphthène</b>	15,6	3,1
<b>Fluorène</b>	108,9	15,7
<b>Phénanthrène</b>	279,2	38,8
<b>Anthracène</b>	146,9	21,8
<b>Fluoranthène</b>	417,1	52,8
<b>Pyrène</b>	181,8	22,0
<b>Benzo(a)anthracène*</b>	154,0	17,1
<b>Chrysène*</b>	159,4	19,7
<b>Benzo(b)fluoranthène*</b>	175,1	22,6
<b>Benzo(k)fluoranthène*</b>	89,0	10,8
<b>Benzo(a)pyrène*</b>	134,3	16,4
<b>Dibenzo(a,h)anthracène</b>	140,2	12,3
<b>Benzo(g,h,i)pérylène</b>	58,2	9,2
<b>Indéno(1,2,3-cd)pyrène*</b>	89,8	12,1
<b>HAP totaux</b>	<b>2181,9</b>	<b>286,2</b>
<b>HAP cancérigènes*</b>	<b>705,9</b>	<b>90,9</b>

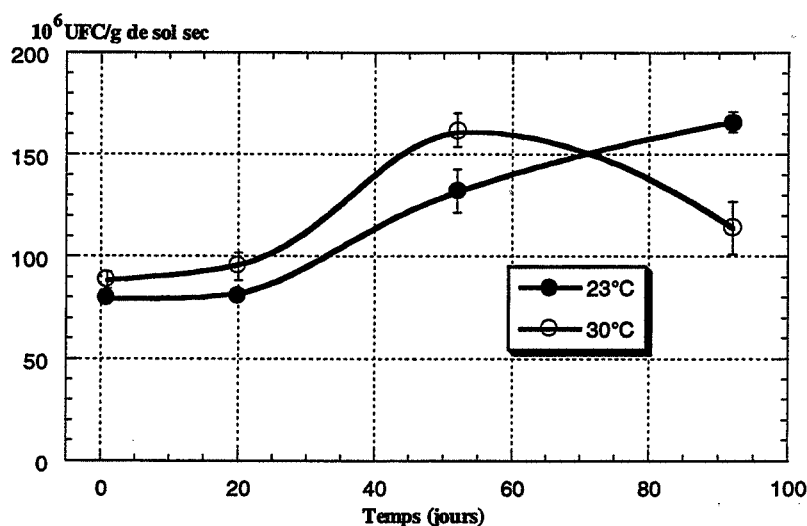
**Tableau V.3-a :** Teneurs initiales en les 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. \* = HAP suspectés d'être cancérigènes.

Remarquons que nous n'observerons pas nécessairement la même intensité de biodégradation dans cet échantillon de sol à 23°C que dans celui utilisé au V.2. Le prélèvement ayant 1 an d'écart, les caractéristiques de la biodégradation potentielle peuvent avoir changé (si la population microbienne a été modifiée pendant cette année de différence par exemple). Nous avons travaillé ici dans les mêmes conditions que la condition 1 (pH=7,2, 20% d'humidité, aération hebdomadaire) aux 2 températures étudiées.

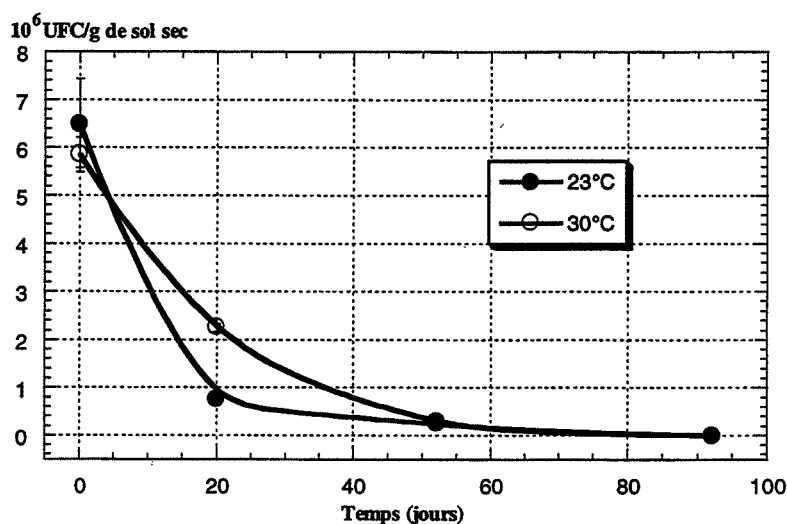
### V.3.1 – Evolution de la population microbienne

Le niveau de la population de bactéries et Actinomycètes dans les 2 microcosmes de sol est similaire à 23°C et à 30°C (Figure V.3.1-a).

Jusqu'à 50 jours d'incubation, les dénombrements sont légèrement supérieurs à 30°C, mais cette tendance est inversée après 65 jours d'incubation. Cette différence de température n'a donc pas une très forte influence sur la population de bactéries et Actinomycètes, dont les températures optimales sont souvent dans cette zone.



**Figure V.3.1-a :** Population microbienne (bactéries et Actinomycètes) des microcosmes de sol à 23°C et 30°C.



**Figure V.3.1-b :** Population microbienne (levures et champignons) des microcosmes de sol à 23°C et 30°C.

En ce qui concerne la population de levures et champignons (Figure V.3.1-b), nous observons une chute de la quantité de population entre le premier et le 20<sup>ème</sup> jour d'incubation à 30°C et à 23°C.

Ce phénomène se poursuit ensuite au cours de l'incubation, la chute est un peu plus rapide à 23°C qu'à 30°C. A partir de 45 jours d'incubation, les niveaux de population sont identiques aux 2 températures. La variation de température de 23°C à 30°C a donc également peu d'influence sur le devenir de la population de champignons et levures du sol.

### V.3.2 – Dégradation globale des HAP

La Figure V.3.2-a représente la comparaison de l'évolution du taux de dégradation des HAP totaux et des HAP cancérigènes aux températures de 23°C et 30°C.

En ce qui concerne les HAP totaux, la biodégradation est plus rapide à 30°C, mais la dégradation a la même intensité à 95 jours d'incubation. A 30°C, le maximum de dégradation des HAP totaux est déjà atteint à 60 jours, pas à 23°C.

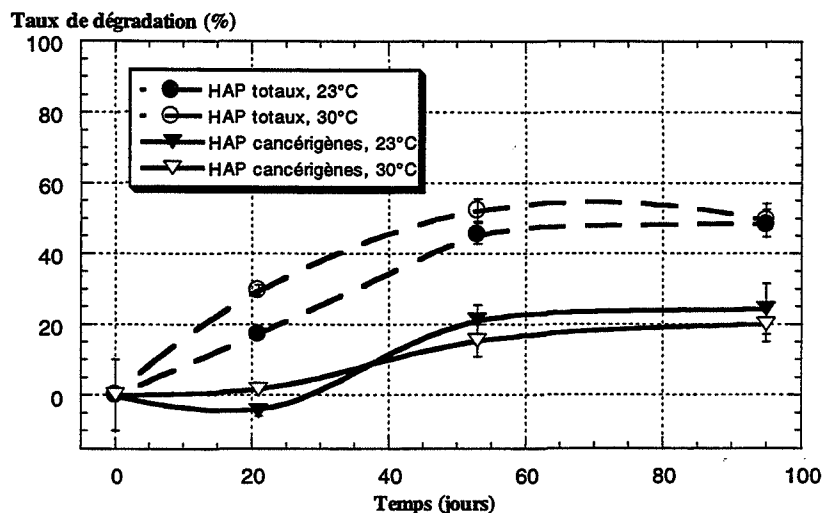


Figure V.3.2-a : Taux de dégradation (%) des HAP totaux et cancérigènes en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

En ce qui concerne les HAP cancérigènes, on atteint à 95 jours 25% de dégradation à 23°C, 20% à 30°C. En fait, si on considère les écarts-types, la dégradation est la même. Il semble donc que l'augmentation de température n'améliore pas la biodégradation (vitesse et efficacité) des HAP cancérigènes.

Nous allons dans la suite étudier l'effet de cette augmentation de température sur les 16 HAP cibles individuellement.

### V.3.3 – Dégradation par famille de HAP

#### V.3.3.1 – Naphtalène, acénaphtylène, acénaphène

A la Figure V.3.3.1-a, nous avons représenté le taux de dégradation du naphtalène, de l'acénaphtylène et de l'acénaphène aux deux températures étudiées.

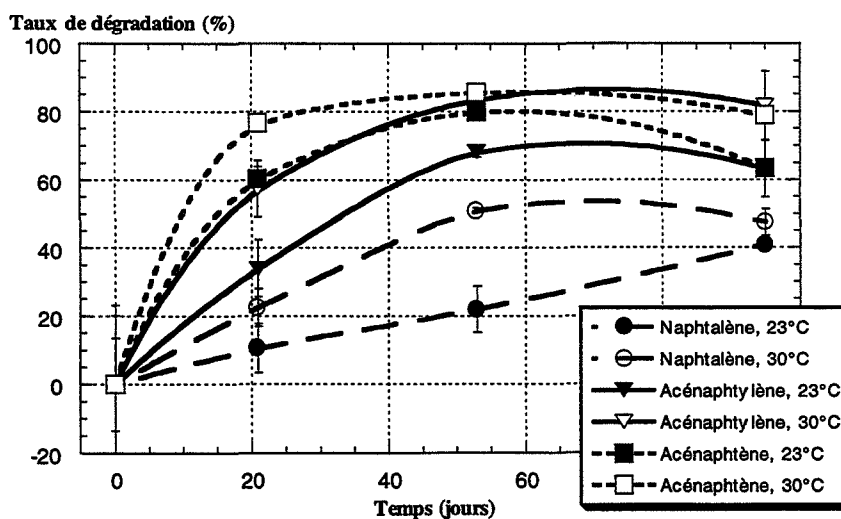


Figure V.3.3.1-a : Taux de dégradation (%) du naphtalène, de l'acénaphtylène et de l'acénaphène en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.



Dans tous les cas, l'augmentation de température de 23°C à 30°C améliore la biodégradation de ces HAP.

Le naphthalène est biodégradé plus rapidement, mais sa teneur est la quasiment la même à 95 jours pour les 2 températures. La dégradation de l'acénaphthylène et de l'acénaphthène est accélérée par l'augmentation de température. Le taux de dégradation à 95 jours est plus élevé : 80% à 30°C contre 65% à 23°C.

V.3.3.2 – 3 cycles : fluorène, phénanthrène, anthracène

Les profils de dégradation du fluorène, du phénanthrène et de l'anthracène sont similaires entre eux et aux 2 températures étudiées (Figure V.3.3.2-a).

La dégradation est un peu plus rapide à 30°C qu'à 23°C, mais l'effet est moins élevé que pour les HAP décrits au V.3.3.1.

Les taux de dégradation à 95 jours sont presque identiques aux deux températures : entre 80 et 85% pour le fluorène, entre 75 et 80% pour le phénanthrène et l'anthracène.

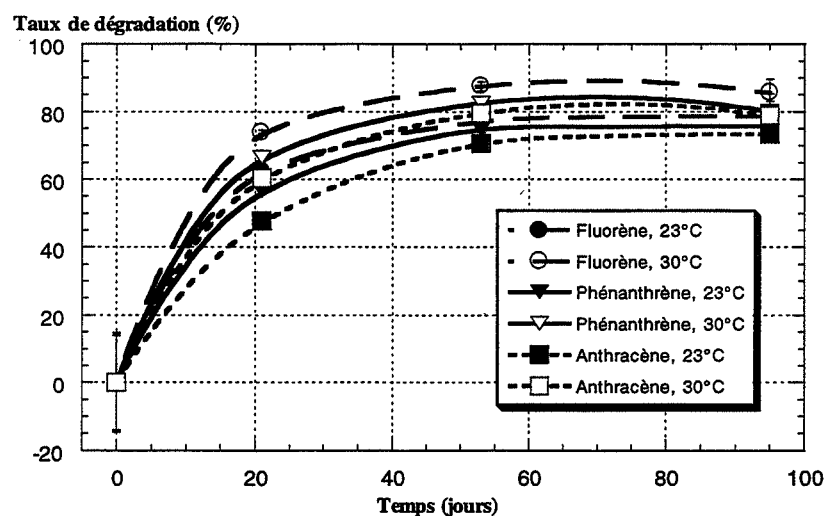


Figure V.3.3.2-a : Taux de dégradation (%) du fluorène, du phénanthrène et de l'anthracène en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

V.3.3.3 – 4 cycles : fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène

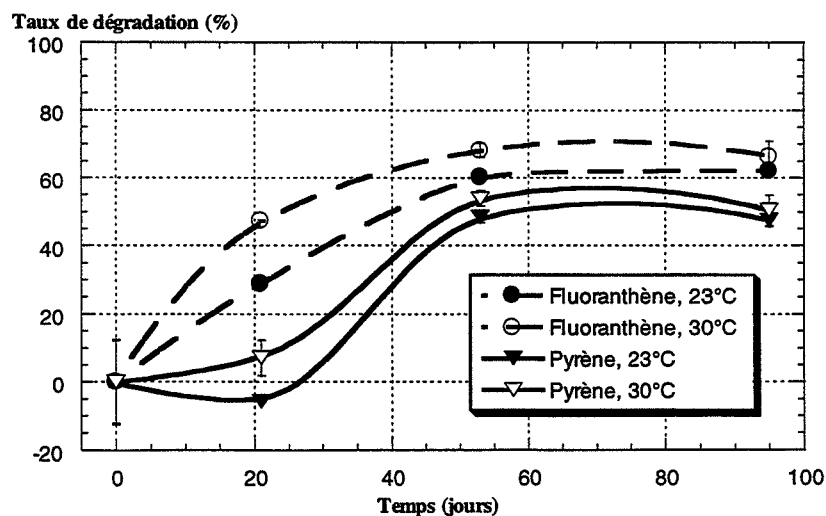
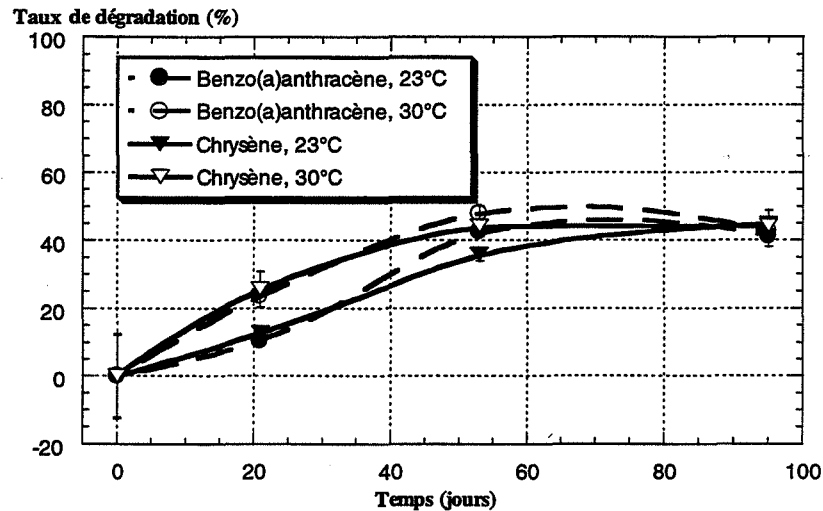


Figure V.3.3.3-a : Taux de dégradation (%) du fluoranthène et du pyrène en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

La vitesse de dégradation du fluoranthène et du pyrène (HAP à 4 cycles non cancérigènes) est augmentée à 30°C par rapport à 23°C. Le taux de dégradation atteint aux deux températures est de 65% pour le fluoranthène, de 50% pour le pyrène (Figure V.3.3.3-a).

Il en est de même pour le benzo(a)anthracène et le chrysène (cancérigènes). La dégradation finale de ces HAP est de 45% aux deux températures (Figure V.3.3.3-b).

Donc pour les 4 HAP à 4 cycles, l'augmentation de température considérée (de 23°C à 30°C) augmente la vitesse de biodégradation .



**Figure V.3.3.3-b :** Taux de dégradation (%) du **benzo(a)anthracène** et du **chrysène** en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

V.3.3.4 – 5 cycles : benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène

Dans cette étude, avec ce 2<sup>ème</sup> prélèvement de sol, une légère biodégradation du benzo(b)fluoranthène semble émerger, ce qui n'a pas été observé dans le premier prélèvement : entre 15 et 25% après 95 jours d'incubation (Figure V.3.3.4-a). Ici, la teneur initiale en benzo(b)fluoranthène est de 175,1 mg/kg, ce qui est une teneur supérieure à celles mesurées dans le premier prélèvement. La biodégradation demeure néanmoins faible et est donc à confirmer.

Pour le benzo(k)fluoranthène, nous atteignons entre 25% et 30% de dégradation (Figure V.3.3.4-a) à 95 jours, comme au V.2.3.4.

La biodégradation du benzo(a)pyrène à 95 jours est de 15%, cette valeur étant atteinte de façon régulière (Figure V.3.3.4-b). Elle semble donc significative, mais n'en demeure pas moins faible comme au V.2.3.4.

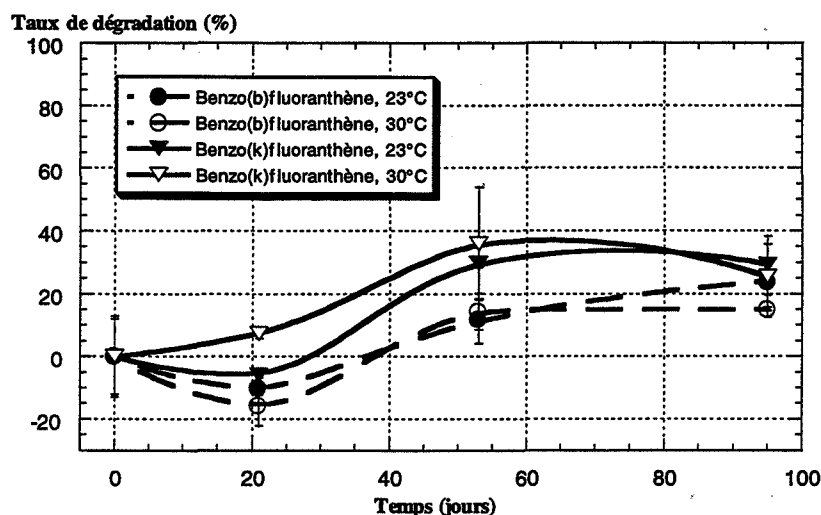


Figure V.3.3.4-a : Taux de dégradation (%) du **benzo(b)fluoranthène** et du **benzo(k)fluoranthène** en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

Pour ces 3 HAP à 5 cycles, suspectés d'être cancérogènes, l'effet de l'augmentation de la température sur la vitesse de dégradation est plus faible que pour les HAP à 2 et 3 cycles. Il est même inexistant pour le benzo(b)fluoranthène.

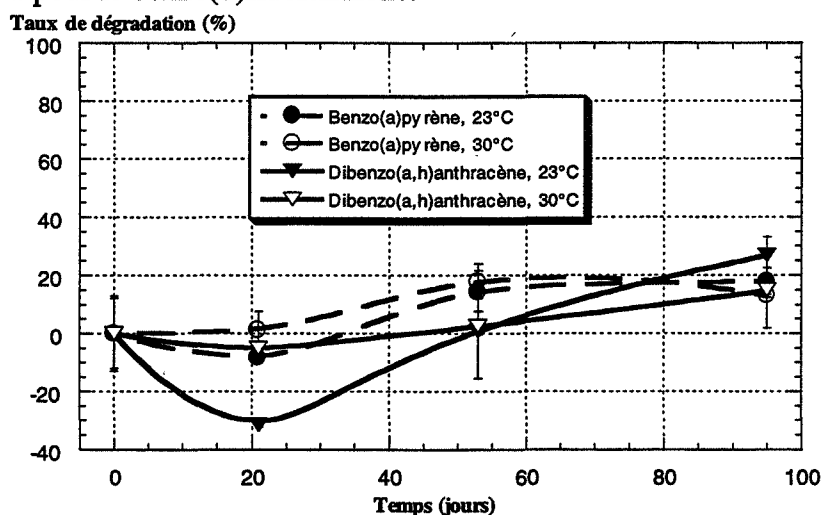


Figure V.3.3.4-b : Taux de dégradation (%) du **benzo(a)pyrène** et du **dibenzo(a,h)anthracène** en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

Pour le dibenzo(a,h)anthracène, nous observons d'importants écarts-types et une fluctuation de  $\pm 30\%$  autour de zéro : il semblerait qu'il n'y ait pas de biodégradation (Figure V.3.3.4-b). Nous avons évoqué les problèmes de la quantification du dibenzo(a,h)anthracène au V.2.3.4.

#### V.3.3.5 – 6 cycles : benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

L'évolution des teneurs (et donc du taux de dégradation) en benzo(g,h,i)pérylène et en indéno(1,2,3-cd)pyrène est la même à 23°C et à 30°C (Figure V.3.3.5-a).

Pour le benzo(g,h,i)pérylène, les écarts-types sont importants et les taux fluctuent de manière importante : nous considérerons qu'il n'y a pas de biodégradation, aux deux températures.

Le taux de dégradation de l'indéno(1,2,3-cd)pyrène est d'environ 20% (à 23°C et 30°C) après 95 jours d'incubation, ce qui correspond à une teneur résiduelle d'environ 70 mg/kg. Si nous nous référons au V.2.3.5, la teneur finale résiduelle (peut-être d'équilibre) était de 35 mg/kg : la biodégradation n'est donc sans doute pas terminée ici à 95 jours.

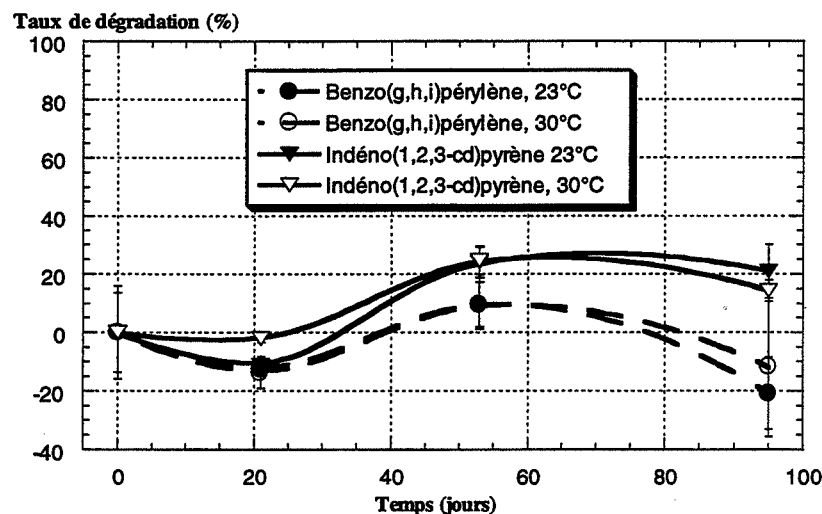


Figure V.3.3.5-a : Taux de dégradation (%) du **benzo(g,h,i)pérylène** et de **l'indéno(1,2,3-cd)pyrène** en microcosmes de sol (pH=7,2, 20% d'humidité) à 23°C et 30°C.

#### V.3.4 – Calcul des demi-vies

Par le calcul des demi-vies (temps auquel le taux de dégradation est égal à 50%), nous visualisons bien l'augmentation de la vitesse de dégradation due à l'augmentation de température de 23°C à 30°C pour le naphthalène, l'acénaphthylène et l'acénaphthène (Tableau V.3.4-a).

L'effet de l'augmentation de température sur les demi-vies du fluorène et du phénanthrène est faible (2 à 3 jours de moins à 30°C), mais il est vrai que les demi-vies de ces 2 HAP à 3 cycles sont déjà courtes. L'amélioration ne peut donc être que limitée. Remarquons que les valeurs calculées ici sont très proches de celles données dans le Tableau V.2.4-a, qui étaient de 14 jours et 17 jours pour respectivement le fluorène et le phénanthrène dans la condition 1 (20% d'humidité, pH=7,2, 23°C).

La demi-vie de l'anthracène passe ici de 23 jours à 23°C (elle était de 30 jours dans le Tableau V.2.4-a) à 15 jours à 30°C. L'accélération de la biodégradation due à la température est donc significative.

De même, l'effet de l'augmentation de température sur l'accélération de la vitesse de biodégradation est réel sur le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène (HAP à 4 cycles).

Par contre, à partir du chrysène, aucun effet notable de la température sur la biodégradation n'est mis en évidence. Le processus de biodégradation est trop lent et son intensité trop faible pour être notables. Il n'est pas possible de calculer les demi-vies : soit la biodégradation n'existe pas, soit elle est au maximum de l'ordre de 20%.

Demi-vies en jours	2 <sup>ème</sup> prélèvement	
	23°C	30°C
Naphtalène	>95	60
Acénaphtylène	35	18
Acénaphène	16	10
Fluorène	14	11
Phénanthrène	15	13
Anthracène	23	15
Fluoranthène	40	23
Pyrène	57	49
Benzo(a)anthracène*	>95	60
Chrysène*	>95	>95
Benzo(b)fluoranthène*	>95	>95
Benzo(k)fluoranthène*	>95	>95
Benzo(a)pyrène*	>95	>95
Dibenzo(a,h)anthracène	>95	>95
Benzo(g,h,i)pérylène	>95	>95
Indéno(1,2,3-cd)pyrène*	>95	>95

**Tableau V.3.4-a :** Demi-vies (en jours) des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. dans le sol du 2<sup>ème</sup> prélèvement. Incubation à pH=7,2, 20% d'humidité, aux températures de 23°C et 30°C. \* : HAP suspectés d'être cancérogènes.

#### V.4 – Conclusion sur l'influence des paramètres environnementaux

Nous avons caractérisé la pollution par des HAP d'un sol d'ancienne usine à gaz et mis au point une méthode d'analyse des HAP dans le sol. Cette méthode est comparable à celle d'un laboratoire extérieur à l'Ecole des Mines. La pollution par les HAP est de l'ordre de 2.000 mg/kg de sol sec. Cette teneur justifie la recherche de moyens de dépollution du sol.

Nous avons vu qu'une microflore indigène active existe dans ce sol, microflore qui possède une activité de dégradation envers un certain nombre des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A.. Les HAP pour lesquels apparaît une diminution notable de leur teneur dans le sol sont essentiellement des HAP de 3 et 4 cycles. Quelques HAP de 5 et 6 cycles semblent pouvoir être dégradés, mais avec des taux nettement plus faibles.

Nous avons d'abord étudié la dégradation dans le sol à une température de 23°C, dans 5 conditions différentes de pH, humidité, addition ou non de sciure. Ces conditions sont les suivantes :

- Condition 1 : 20% d'humidité, pH=7,2,
- Condition 2 : 20% d'humidité, pH=7,2, 30% (w/w) sciure,
- Condition 3 : 27% d'humidité, pH=7,2,
- Condition 4 : 27% d'humidité, pH=5,3,
- Condition 5 : 27% d'humidité, pH=5,3, 30% (w/w) sciure.

Nous nous sommes placés à 20% et 27% d'humidité, soit respectivement 37% et 50% de la W.H.C., pour favoriser l'apparition de mécanismes de dégradation aérobies. En effet, l'une de nos intentions est de déterminer l'existence d'une dégradation dans le sol afin de

sélectionner des micro-organismes performants. Or, la manipulation de micro-organismes anaérobies est délicate, et n'est pas possible dans notre laboratoire, il est donc logique de rechercher la mise en évidence dans le sol d'une dégradation aérobie des HAP.

Nous avons évalué les populations microbiennes (en termes de dénombrements) du sol dans les 5 conditions étudiées au cours de l'incubation.

La dégradation s'accompagne là bien d'une augmentation des dénombrements, mais la population la plus nombreuse n'est pas nécessairement associée à la dégradation des HAP la plus élevée. Le suivi de la quantité de population microbienne n'est pas un très bon traceur de l'intensité de la dégradation.

Nous continuerons toutefois à réaliser ces mesures : si des dénombrements élevés n'impliquent pas nécessairement une biodégradation élevée, par contre une absence de micro-organismes implique une absence de biodégradation.

En termes de HAP totaux, une biodégradation est mise en évidence dans les 5 conditions étudiées. Dans les conditions 1 et 2, la dégradation finale est de l'ordre de 70%, contre environ 50% dans les conditions 3 et 5. Si nous prenons en compte les écarts-types (Figure V.2.2.1-a), ces taux de dégradation peuvent toutefois être considérés similaires.

Pour les HAP cancérigènes selon l'U.S. E.P.A. considérés ici, la dégradation finale est de l'ordre de 40-50%. Etant constitués de davantage de cycles que les HAP non cancérigènes considérés ici, ils sont moins biodégradables.

Il semble que les différentes conditions étudiées influencent la cinétique de la dégradation, mais pas l'équilibre final du sol en termes de teneur en HAP, et il est possible d'écrire :

- la biodégradation est plus rapide à 20% d'humidité qu'à 27%,
- la biodégradation est plus rapide à pH=7,2 qu'à pH=5,3,
- l'addition de sciure accélère la biodégradation par diminution de la compacité du sol,
- l'addition de sciure combinée à la baisse du pH à 5,3 est la condition qui accélère la plus la biodégradation des HAP cancérigènes.

La biodégradation du naphthalène et de l'acénaphthène n'a pas été mise en évidence.

L'acénaphthylène est biodégradé dans les conditions 3, 4 et 5. La biodégradation atteint 80% en 30 jours d'incubation et 90% à 110 jours.

La biodégradation finale des autres HAP de 3 cycles varie entre 90% (phénanthrène et anthracène) et 95% (fluorène).

Pour les 4 HAP de 4 cycles, les courbes de dégradation sont similaires. Le fluoranthène, le pyrène et le benzo(a)anthracène atteignent 80% de dégradation, le chrysène atteint 60%.

En ce qui concerne les HAP de 5 cycles, le benzo(b)fluoranthène et le dibenzo(a,h)anthracène ne sont pas biodégradés. Le benzo(k)fluoranthène est dégradé dans les conditions 3, 4 et 5 au maximum à 50% à 110 jours. Le benzo(a)pyrène est dégradé dans la condition 5 seulement, à 25% à 110 jours.

Pour les HAP de 6 cycles, aucune biodégradation du benzo(g,h,i)pérylène n'apparaît, alors que l'indéno(1,2,3-cd)pyrène est dégradé dans les conditions 3, 4 et 5, au mieux à 50% à 110 jours (la condition 5 étant la plus rapide).

Pour les HAP de 3 et 4 cycles, les conclusions sur les paramètres étudiés sont identiques à celles faites pour les HAP totaux. Pour les HAP de 5 et 6 cycles, pour lesquels

une biodégradation a pu être mise en évidence, nous compléterons avec la remarque faite pour les HAP cancérigènes.

L'augmentation de température de 23°C à 30°C accélère la biodégradation des HAP jusqu'au chrysène (2, 3 et 4 cycles), mais n'a pas d'effet particulier sur les HAP plus gros.

Les HAP pour lesquels une biodégradation a été mise en évidence dans le sol pollué sont donc l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)anthracène, le chrysène, le benzo(k)fluoranthène, et en moindres proportions et une interrogation, le benzo(a)pyrène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène.

Les modifications des conditions d'humidité, de température, de pH et d'aération (par l'addition de sciure) influencent les vitesses de dégradation des HAP mais pas leurs teneurs en fin d'incubation. Il semble qu'un équilibre existe et qu'il n'est pas déplacé.

Aussi, nous proposons d'inoculer le sol pollué avec des micro-organismes sélectionnés pour leur capacité de dégrader les HAP afin d'accélérer le processus de dégradation. La dégradation naturelle nécessite ici environ 2 mois pour atteindre l'équilibre, il serait donc intéressant de gagner du temps. Cette inoculation permettrait peut-être en outre de déplacer l'équilibre final du sol en HAP vers des teneurs plus faibles.

D'après la liste des HAP cibles donnée ci-dessus, nous choisissons de sélectionner des micro-organismes sur le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène comme seule source de carbone. Ces HAP étant biodégradables, il doit être possible de sélectionner des micro-organismes issus du sol pollué capables de les dégrader. Par contre, sur des HAP dont la biodégradation dans le sol n'a pas été démontrée au V, les chances de réussite sont faibles et donc les chances d'obtenir des résultats également. Aussi, nous voulons d'abord valider notre protocole avant de nous engager dans des entreprises trop hasardeuses.

Nous n'avons pas choisi le benzo(a)anthracène ni le chrysène à cause de leur coût. Si la sélection réussit sur le fluoranthène et le pyrène, elle aura des chances de réussir aussi sur ces HAP et pourra être faite ultérieurement si cela est jugé nécessaire. Il en est de même pour le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)pyrène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène, la biodégradation de ces composés dans le sol utilisé ici étant en outre sujette à caution.

En outre, les HAP de poids moléculaire élevé (5 et 6 cycles) sont plus souvent dégradés par cométabolisme. Il est donc possible que l'utilisation de micro-organismes dégradant des HAP de 3 ou 4 cycles induise la dégradation des HAP plus gros par un tel phénomène.

Nous allons donc dans la suite exposer les résultats de la sélection et de l'étude des ces micro-organismes ainsi que de leur inoculation dans du sol pollué par des HAP.

## **CHAPITRE VI :**

### **SELECTION EN BATCH ET IDENTIFICATION DE MICRO-ORGANISMES UTILISANT DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) COMME SEULE SOURCE CARBONÉE**

#### **VI.1 – Sélection en batch**

##### **VI.1.1 – Choix des HAP cibles.**

Nous avons choisi cinq polluants cibles pour la sélection de micro-organismes adaptés à la dégradation des HAP : le **fluorène**, l'**anthracène**, le **phénanthrène**, le **fluoranthène** et le **pyrène**. Ce sont des molécules de 3 et 4 cycles aromatiques dont les structures et les propriétés ont été décrites au III.4.1.

Notre choix a donc été guidé par les éléments suivants :

- Le sol réel pollué, issu d'une ancienne usine à gaz, à partir duquel nous travaillons, contient ces composés en quantité importante. Ils représentent la majorité de la pollution (environ 65% des HAP totaux à eux cinq, sur seize HAP pris en compte).
- Ils ne sont pas considérés comme cancérigènes et sont par conséquent plus aisément manipulables que d'autres HAP. Comme il s'agit de la première fois que nous utilisons des HAP au sein du laboratoire, nous n'aurions pas pu faire face aux problèmes de sécurité induits par l'utilisation de composés suspectés d'être cancérigènes. En outre, leur coût est de l'ordre de 1 à 2 francs le gramme contre des coûts de respectivement 822 et 1500 francs par gramme pour le benzo(a)pyrène, le benzo(k)fluoranthène par exemple.
- Notre protocole de sélection n'étant pas validé, nous voulions nous mettre dans des conditions de travail plutôt favorables pour obtenir un résultat. Le choix de HAP à 3 et 4 cycles nous permettait de supposer que les expériences engagées seraient moins longues que pour des HAP plus gros et que le travail pourrait donc s'inscrire dans la durée d'une thèse.
- Dans l'étude dans le sol réel (présentée au V), nous avons observé une biodégradation naturelle élevée (de 70 à 90% selon le HAP) de ces composés dans le sol pollué qui nous sert de base de travail.

La sélection a été faite en utilisant de faibles quantités de HAP dans le milieu, car si la quantité est trop élevée, alors des micro-organismes qui ne dégradent les HAP que lorsque la concentration en polluant est élevée peuvent être favorisés. Ceci n'est pas intéressant pour atteindre des faibles teneurs en fin de dégradation.

##### **VI.1.2 – Mise en évidence de la sélection**

Nous désignerons par la suite par FN le consortium de micro-organismes sélectionné sur le fluorène, PT sur le phénanthrène, AT sur l'anthracène, FT sur le fluoranthène, PY sur le pyrène.

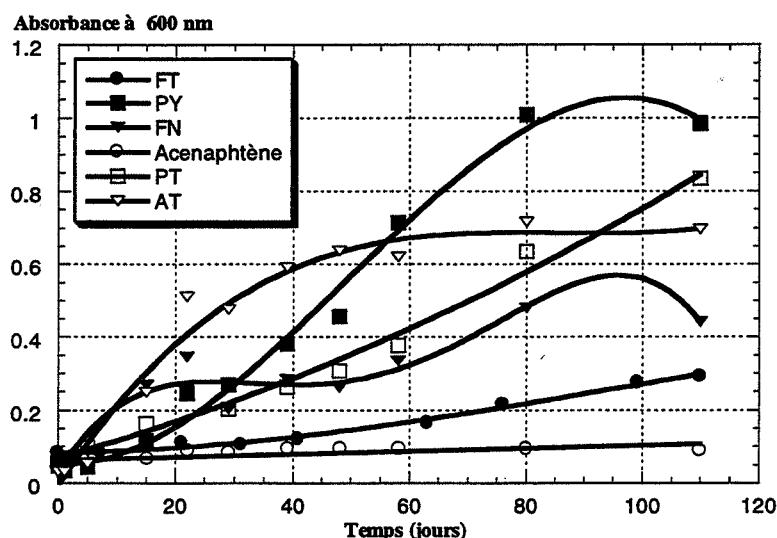
La croissance a été mise en évidence selon le protocole décrit dans la partie Matériels et Méthodes au IV.2.1, dans les conditions de culture suivantes : fioles d'Erlenmeyer de 125 ml contenant 25 ml de milieu MSM (donc remplies au 1/5<sup>ème</sup>), 1 mg/ml de cristaux de HAP (énumérés ci-dessus), à 23°C, sous agitation orbitale à 110 tours/mn.



### VI.1.2.1 – Par la turbidité du milieu de culture

Des contrôles de croissance ont été réalisés : milieu MSM avec source carbonée non inoculé, milieu MSM inoculé sans source carbonée. Aucune croissance (modification de l'absorbance à 600 nm) n'a été observée.

Dans une sélection menée sur l'acénaphthène, aucune croissance n'a été observée. Ceci montre que le protocole utilisé ne donne pas systématiquement un résultat positif. L'échec de la sélection sur acénaphthène est sans doute dû à la faible teneur en acénaphthène du sol pollué utilisé, qui a probablement impliqué une absence de population microbienne adaptée à la dégradation de l'acénaphthène.



**Figure VI.1.2.1-a :** Mise en évidence de la sélection de micro-organismes capables de croître sur différents HAP comme seule source carbonée par mesure de turbidité.

La croissance de la sélection FT sur le fluoranthène est très lente, beaucoup plus que celles des sélections PT, PY, AT et FN respectivement sur le phénanthrène, le pyrène, l'anthracène et le fluorène.

### VI.1.2.2 – Par la modification des spectres d'absorption UV-visible des surnageants

La Figure VI.1.2.2-a montre l'évolution des spectres d'absorption UV-visible des surnageants des cultures PT, PY et AT sélectionnées respectivement sur le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène.

Nous ne montrons pas ici les résultats obtenus avec FN et FT, mais des modifications significatives sont également observées au cours du temps. Par ailleurs, dans les témoins non inoculés, les spectres sont identiques quelle que soit la durée d'incubation.

Les produits obtenus sont donc différents selon la source de carbone : il peut s'agir de produits de dégradation des HAP, mais aussi de pigments microbiens.

Des colorations visibles à l'œil nu apparaissent : pour FT, il s'agit d'une coloration brun-marron, alors que pour AT, PY et PT, il s'agit d'une couleur plutôt rose-orangé, transitoire pour PT (les trois premières semaines de culture) mais permanente pour AT et PY.

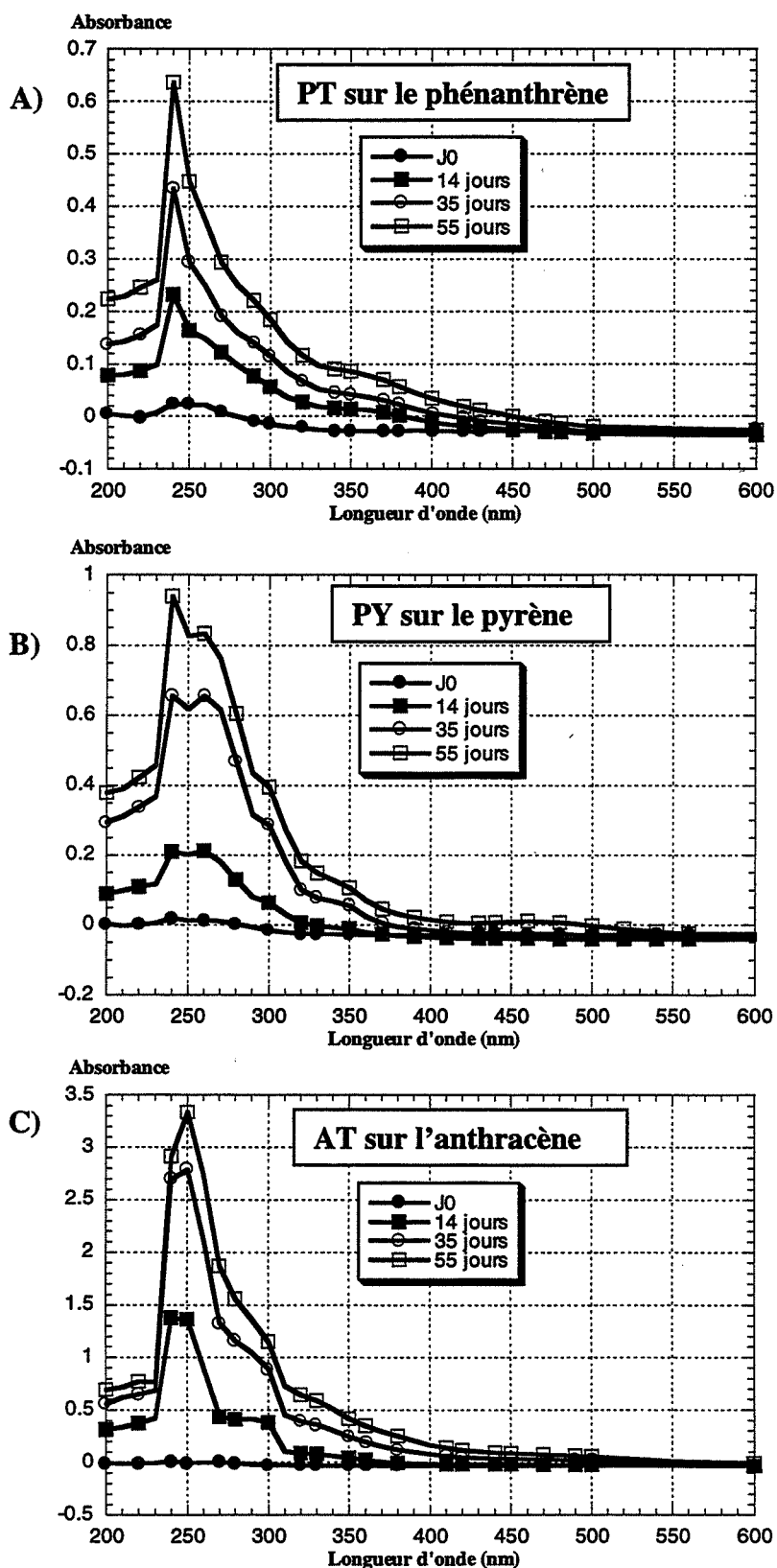


Figure VI.1.2.2-a : Evolution des spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture lors de la mise en évidence de la sélection de PT sur le phénanthrène (A), PY sur le pyrène (B) et AT sur l'anthracène (C).

Les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture sur l'acénaphène ne sont pas modifiés au cours du temps.

**VI.1.3 – Bilan**

Les courbes expérimentales (pour 11 points expérimentaux) de croissance des consortia FT, AT, PT, PY et FN sont approchées par des polynômes de degré 2 à 4 avec des coefficients de corrélation satisfaisants.

En fait, une corrélation linéaire est suffisante pour FT (Tableau VI.1.3-a) entre 30 et 100 jours de culture, avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,99.

Consortium	Degré du polynôme	Coefficient de corrélation (R)
AT	3	0,985
PT	2	0,991
	linéaire de 22 à 110 jours	0,993
PY	3	0,994
	linéaire de 29 à 80 jours	0,990
FN	4	0,963
FT	3,	0,967
	linéaire de 30 à 110 jours	0,995

**Tableau VI.1.3-a :** Polynômes approchant les courbes de croissance des consortia AT, PT, PY, FN et FT, et coefficients de corrélation correspondants.

Sur la Figure VI.1.2.1-a, nous n'observons pas de phase de latence, sauf pour PY. La deuxième mesure ayant été réalisée à 5 jours, cela implique donc que la phase de latence des autres consortia est inférieure à 5 jours. Nous ne pouvons pas dégager la notion de temps de génération car les cultures présentées ici sont des mélanges de micro-organismes.

La croissance du consortium FT est bien plus lente que celle de PT, AT, PY et FN, et elle est linéaire (Figure VI.1.2.1-a) de 30 à 100 jours. Ce consortium a été retenu car les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture de FT sont complètement différents de ceux de PY, PT, AT et FN, et que l'on observe une coloration brun-marron au lieu de rose-orangé. Nous ne présentons pas ici le spectre du fluoranthène, il le sera ultérieurement au VII.1.3.3.

Pour tous les consortia, les croissances observées sur les HAP sont très lentes. La lenteur de ce processus est d'ailleurs bien soulignée à la Figure VI.1.3-a, qui est l'illustration de la croissance de ces mêmes consortia sur un milieu plus riche (peptone et extrait de viande de bœuf).

Les voies métaboliques empruntées sont certainement très différentes quand la croissance a lieu sur bouillon nutritif par rapport à la croissance sur HAP, mais la biodisponibilité des nutriments est également très différente.

Ainsi, les solubilités aqueuses (S) à 25°C des HAP utilisés sont très faibles (Tableau III.4.1-a) : 3,9 mg/l pour l'acénaphène, 2,0 mg/l pour le fluorène, 1,3 mg/l pour le phénanthrène, 0,26 mg/l pour le fluoranthène, 0,14 mg/l pour le pyrène et 0,07 mg/l pour l'anthracène. Il y a donc très certainement limitation de la croissance par le manque de substrat (cf. III.5.2.1).

Or  $S_{\text{acénaphène}} > S_{\text{fluorène}} > S_{\text{phénanthrène}} > S_{\text{fluoranthène}} > S_{\text{pyrène}} > S_{\text{anthracène}}$  alors que PY ou AT ou PT ont une croissance plus forte que FT et FN.

En effet, la solubilité n'est pas le seul facteur limitant la croissance des micro-organismes sur ces substrats. Des auteurs (Caldini et al., 1995 ; Thomas et al., 1986 ; cf. III.5.2.1) ont montré l'importance de la forme physique et des dimensions des particules en suspension dans les systèmes aqueux sur les taux de croissance. Que la croissance ait lieu au contact des cristaux (des observations faites au microscope optique nous ont montré que les cristaux étaient entourés de bactéries) ou dans la phase aqueuse, la cinétique de transfert des HAP en solution est essentielle (Bouchez et al., 1995, 1996; cf. III.5.2.1), ce qui peut expliquer la lenteur des croissances observées.

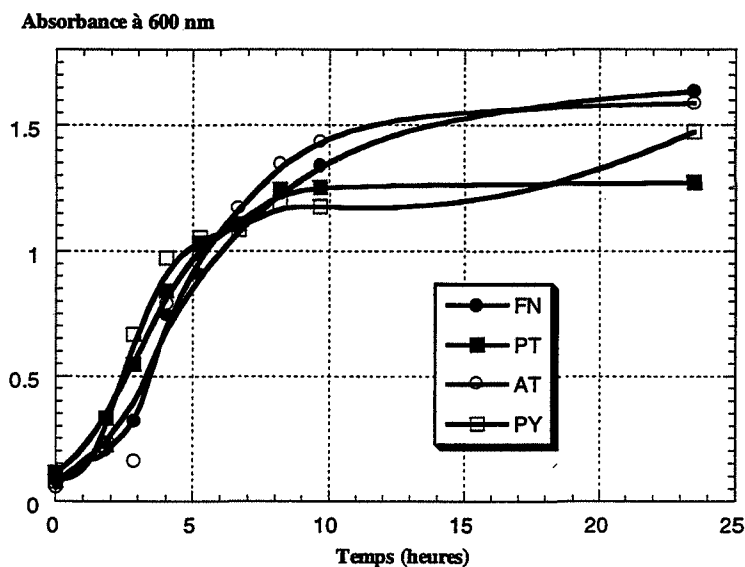


Figure VI.1.3-a : Croissance des consortia AT, PT, PY et FN sur bouillon nutritif.

En ce qui concerne le consortium FT, une croissance linéaire est observée (Figure VI.1.2.1-a). Volkering et al. (1992) ont mis en évidence une croissance linéaire de la concentration en biomasse semblable à la croissance linéaire des bactéries et levures sur les substrats faiblement solubles : ceci a lieu quand le taux de croissance intrinsèque des micro-organismes est supérieur au taux de dissolution (ou de transfert dans la phase aqueuse).

De même, PY et PT présentent des phases linéaires (affines en fait) de croissance : de 29 à 80 jours pour PY, de 22 à 110 jours pour PT : il y a donc sans doute limitation de la croissance par la dissolution du pyrène et du phénanthrène. Les courbes de croissance de FN et AT ne présentent pas de phase exponentielle de croissance, ni de phase linéaire.

## VI.2 – Identification des micro-organismes constituant les consortia FT, PT, PY et AT

Les micro-organismes composant les consortia FT, PT, PY et AT étant inconnus, il est important, pour différentes raisons, de procéder à leur identification :

- pour savoir ce que nous manipulons, en particulier par rapport au personnel du laboratoire,
- pour déterminer s'il serait raisonnable d'envisager l'utilisation de ces micro-organismes hors du laboratoire, par exemple en dépollution *in situ*,
- notre mode de sélection a-t-il favorisé la sélection de bactéries au détriment des levures et des champignons, comme attendu ?
- quelle est la complexité des mélanges microbiens ?
- existe-t-il des liens entre les consortia sélectionnés ?
- retrouve-t-on des espèces de micro-organismes déjà décrites dans la littérature ?

Dans le but d'apporter des réponses à ces multiples soucis et interrogations, nous avons donc mené une campagne d'identification sur les consortia PT, AT, FT et PY, avec la

collaboration et les conseils éclairés du Docteur Alain ROS du Laboratoire de Bactériologie, dirigé par le Professeur POZZETTO, du C.H.U. Hôpital Nord de Saint-Etienne.

### VI.2.1 – Aspect des cultures sur lame

Les Figures VI.2.1-a et VI.2.1-b sont composées de photographies des consortia FT, PT, AT et PY en coloration de Gram et réalisées à l'aide d'un microscope optique.

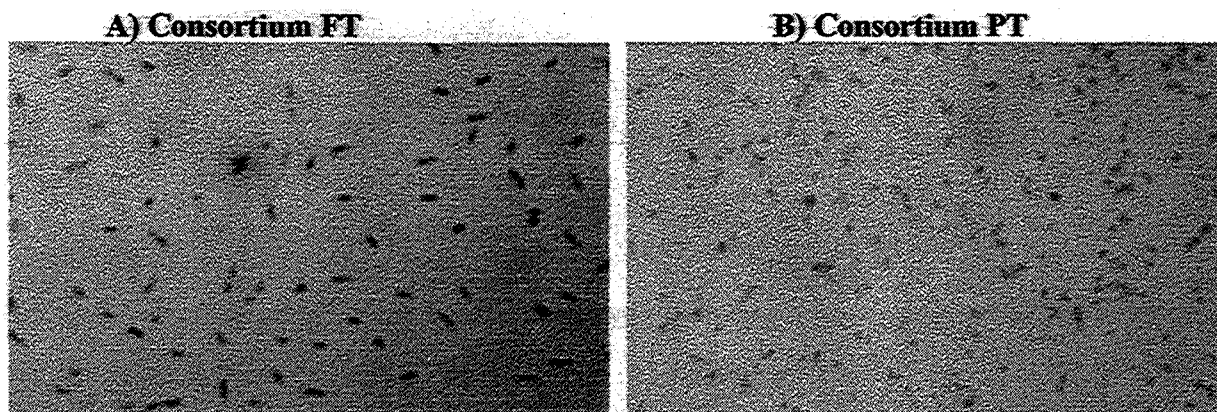


Figure VI.2.1-a : Observation en microscopie optique (x1000) des consortia FT cultivé sur le fluoranthène (A), PT sur le phénanthrène (B) après coloration de Gram.

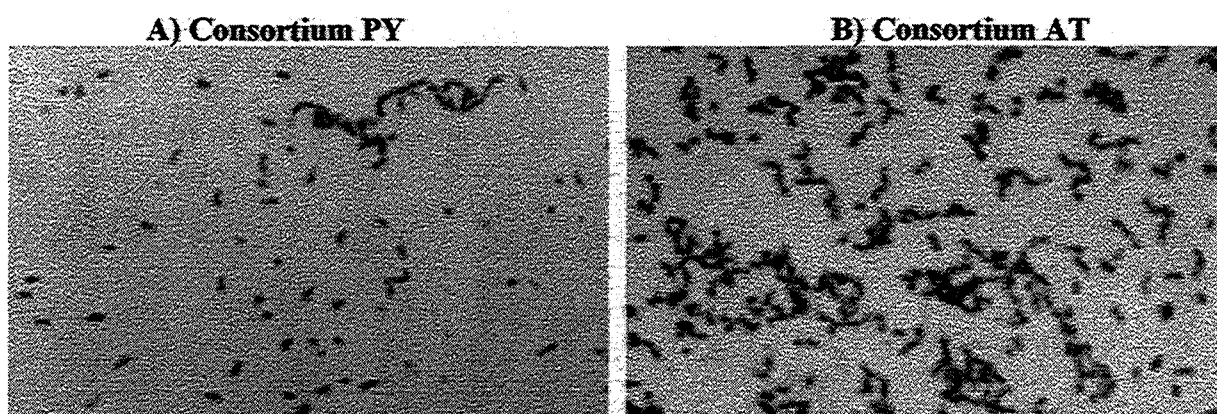


Figure VI.2.1-b : Observation en microscopie optique (x1000) des consortia PY sur le pyrène (A) et AT sur l'anthracène (B) après coloration de Gram.

Les Figures VI.2.1-a et VI.2.1-b nous montrent que les 4 consortia FT, PT, PY et AT sont composés de mélanges de micro-organismes à déterminer.

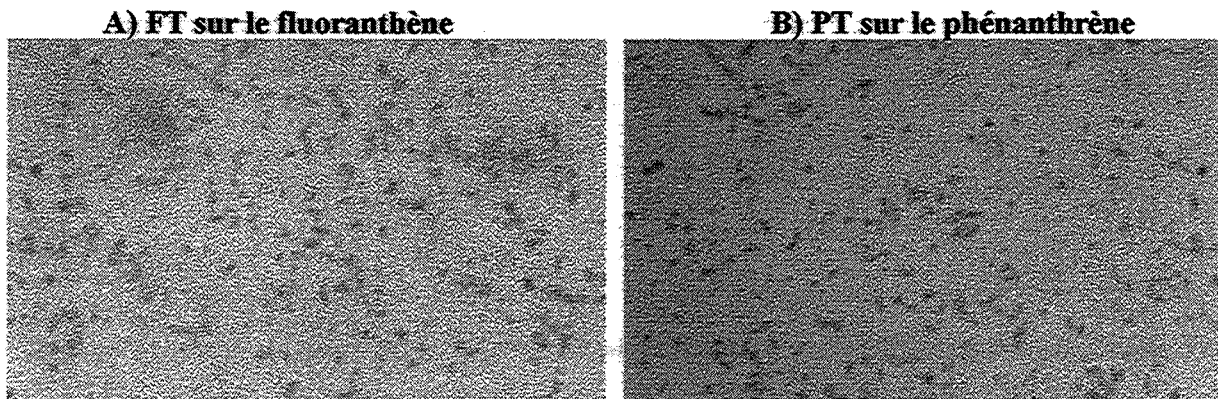
### VI.2.2 – Vérification de la présence de bactéries uniquement

Sachant que le milieu minimal MSM utilisé est supposé, de par son pH et sa composition, favoriser la sélection de bactéries au détriment des levures et des champignons, nous devons vérifier si les consortia sont effectivement constitués uniquement de bactéries (ce que les observations des consortia faites en microscopie optique semblent indiquer, cf. Figures VI.2.1-a et VI.2.1-b). Si oui, cela nous permettra de cibler l'identification sur les bactéries.

Après 3 jours d'incubation, les boîtesensemencées avec FT, PT et AT contenaient de nombreuses (non dénombrables) colonies bactériennes alors que celleensemencée avec PY en contenait moins de 10. Après 7 jours d'incubation, toutes les gélosesensemencées avaient un

aspect similaire, et aucune colonie ressemblant à des colonies de levures ou fongiques n'était mise en évidence.

Pour confirmer ou infirmer ces observations à l'œil nu, nous avons réalisé des colorations de Gram sur les mélanges microbiens à la surface des géloses. Aucun aspect fongique ou de levure n'est apparu. 2 photographies des lames observées au microscope optique (objectif à immersion, x1000), sont données à la Figure VI.2.2-a.



**Figure VI.2.2-a :** Observation en microscopie optique (x1000) des cultures 7 jours sur gélose de Sabouraud à la gentamicine et au chloramphénicol après coloration de Gram. (A) : FT sur le fluoranthène; (B) : PT sur le phénanthrène.

### VI.2.3 – Identification bactérienne

Le consortium FN n'a pas été étudié dans ce cadre car des expériences parallèles (décrites au VII.1) nous ont montré que son intérêt par rapport aux consortia PT, AT, FT et PY était moindre (trop grande spécificité des sources de carbone) et ne justifiait pas le temps que nous aurions dû consacrer à l'identification, soit environ deux mois.

Le nombre de souches différentes obtenues par isolement à partir des consortia, et le résultat de leur coloration de Gram, pour chaque consortium sont résumés dans la Tableau VI.2.3-a.

	PT	AT	FT	PY
Souches Gram+	1	1	1	1
Souches Gram-	10	8	8	16
Total	11	9	9	17

**Tableau VI.2.3-a :** Bilan du nombre de souches isolées par consortium.

Les noms donnés aux souches constituant les différents consortia sont basés sur le nom du consortium d'origine additionné d'une lettre de l'alphabet, fonction de la chronologie d'isolement. Aussi, des lettres manquent : certaines souches isolées étaient redondantes et nous avons conservé alors le nom correspondant à la plus petite lettre.

#### VI.2.3.1 - Consortium PT

11 souches ont été isolées dont une est Gram+, PTG1 (Tableau VI.2.3.1-a). Les nombres indiqués dans le Tableau VI.2.3.1-a correspondent à la probabilité de l'identification (cf. Matériels et Méthodes au IV.4.2.2). Il en sera de même pour les Tableaux VI.2.3.2-a, VI.2.3.3-a et VI.2.3.4-a dans la suite. Les caractères des souches constituant le consortium PT sont détaillés en ANNEXE 8. Ces caractères sont eux expliqués dans les ANNEXES 3 à 7.

	BBL CRYSTAL E/NF	API20NE	Rapid NFplus	MicroScan Neg/Urine Combo Type 5I	MicroScan Pos Combo Type 4I	Mobilité Pousse à 42°C (+ ou -) Ø C390
PTA	<i>Enterobacter sakazaaki</i> (jaune) ou <i>Enterobacter cloacae</i>	?		<i>Enterobacter cloacae</i> (pas jaune)		
PTB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9580 ; 0,98	<i>Pseudomonas putida</i> 99,9%				- 18 mm
PTC	<i>Pseudomonas putida</i> 6340 ; 0,65					
PTD	Bacille gram-167 ; 0,65	<i>Ps. testosteroni</i> / <i>alcaligenes</i> 79,8% <i>Alc. denitrificans</i> 17,2%				Immobile
PTEb	Bacille gram-167 ; 0,65	L'isolement a été trop tardif pour mener l'identification à bien. Les 2 souches PTEb et PTEt sont morphologiquement différentes : l'une est blanche et l'autre translucide. Elles sont toutes deux immobiles.				
PTEt	Bacille gram-167 ; 0,65					
PTF1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 9222 ; 0,47	CDC groupe IV C-2 59%	?			Immobile
PTF2	Bacille gram-	CDC groupe IV C-2 59%	<i>Brevibacterium diminuta</i> 94,89%			
PTG1					<i>Staphylococcus epidermidis</i> 84,9%	
PTG3	Bacille gram-18 ; 0,99		<i>Alcaligenes faecalis</i> 99,96%			
PTJ	Bacille gram-630113 ; 0,98	<i>Alcaligenes denitrificans</i> 93,6%				

**Tableau VI.2.3.1-a** : Bilan des différentes étapes d'identification des souches isolées du consortium PT.

PTF1 et PTF2 sont de morphologies différentes. PTEb et PTEt ont des caractères identiques, mais l'aspect sur boîte des colonies est différent : les premières sont blanches et les secondes translucides. Il s'agit donc bien de deux souches différentes. En outre, leur aspect en coloration de Gram met en évidence une population homogène dans les deux cas : elles semblent donc bien pures. L'isolement de ces souches ayant été difficile, il a donc été tardif et elles n'ont pas été identifiées.

L'identification de PTD en API 20NE (bioMérieux) n'est pas satisfaisante, d'autant plus que cette souche est immobile, ce qui ne correspond à un caractère ni de *Pseudomonas*, ni d'*Alcaligenes*. Elle n'est donc pas identifiée, faute de temps et reste pour nous un bacille Gram-négatif non fermentant non identifié quelconque. PTB et PTC semblent appartenir au genre *Pseudomonas putida*, mais sont toutefois des souches différentes.

#### VI.2.3.2 - Consortium AT

9 souches différentes dont une Gram+, ATD, ont été isolées (Tableau VI.2.3.2-a).

Les caractères des souches constituant le consortium AT sont détaillés en ANNEXE 9.

	BBL CRYSTAL E/NF	API20NE	Rapid NFplus	MicroScan Neg/Urine Combo Type 5I	MicroScan Pos Combo Type 4I	Mobilité Pousée à 42°C (+ ou -) ØC390
ATA	<i>Pseudomonas diminuta</i> 1 ; 0,91					
ATB	?	<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>Brevibacterium diminuta</i> 92%			
ATC	?	<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>Flavobacterium odoratum</i> 99,5%			Immobile
ATD					<i>Micrococcus kristinae</i> 90,6%	
ATE	?	<i>Flavobacterium</i> sp.	<i>Flavobacterium odoratum</i> 99.87%			Immobile
ATF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3 ; 0,99					+ 0 mm
ATG	<i>Pseudomonas putida</i> 169 ; 0,807					
ATH	<i>Enterobacter sakazaaki</i> (si jaune) ou <i>Enterobacter cloacae</i> 25.10 <sup>6</sup> ; 0,98	? formation de bulles		<i>Enterobacter cloacae</i> 99,9%		
ATJ	<i>Flavobacterium odoratum</i> 17373 ; 0,97 ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	?	<i>Flavobacterium odoratum</i>			Immobile

**Tableau VI.2.3.2-a** : Bilan des différentes étapes d'identification des souches isolées du consortium AT.

ATD a été identifié comme *Micrococcus kristinae* en MicroScan Pos Combo Type 4I. ATH possède de nombreux caractères positifs et est donc très particulier vis-à-vis des autres souches isolées. Il n'est pas jaune et la probabilité donnée par le test MicroScan Neg/Urine Combo Type 5I pour l'identifier comme *Enterobacter cloacae* est excellente. Le test dans le système BBL Crystal E/NF, qui nous donnait le choix entre *Enterobacter sakazaaki*, jaune, et *Enterobacter cloacae*, était donc juste, malgré un résultat de probabilité faible.

### VI.2.3.3 - Consortium FT

9 souches morphologiquement différentes ont été isolées, dont une seule était à Gram positif, FTM (Tableau VI.2.3.3-a).

Les caractères des souches constituant le consortium FT sont détaillés en ANNEXE 10. Ces caractères sont eux expliqués dans les ANNEXES 3 à 7.

D'après les résultats obtenus avec la galerie BBL CRYSTAL E/NF, 3 choix, de probabilité égale, sont possibles pour FTK : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ou *Pseudomonas fluorescens*. D'après le test C390, et le résultat de la pousse à 42°C, il ne s'agit pas de *Ps. aeruginosa*. Comme le test gélatinase est négatif en API20NE, il ne s'agit pas de *Pseudomonas fluorescens*. Il s'agit donc sans doute de *Pseudomonas putida*.



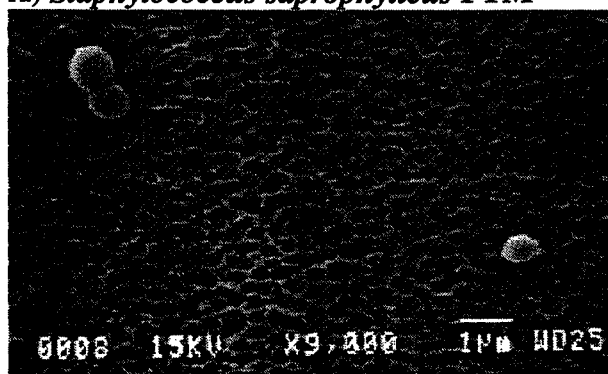
FTF et FTG se ressemblent beaucoup mais sont tout de même différentes (1 réaction biochimique et la nuance de couleur). Il s'agit sans doute d'un *Flavobacterium* qui n'est pas dans la base de données BBL CRYSTAL.

	BBL CRYSTAL E/NF	API20NE	MicroScan Pos Combo Type 4I	Mobilité Pousse à 42°C (+ ou -) Ø C390
FTA	<i>Flavobacterium</i> sp. 3.10 <sup>6</sup> ; 0,86	<i>Flavobacterium multivorum</i> 96,6%		
FTB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 16 ; 0,98	<i>Pseudomonas putida</i> 99,4%		- 17 mm
FTC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3 ; 0,99			+
FTF	<i>Flavobacterium</i> sp. 497 ; 0,88	Colonies jaunes, de deux nuances différentes pour FTF et FTG		Immobile
FTG	<i>Flavobacterium</i> sp. 2499 ; 0,91			Immobile
FTI	<i>Pseudomonas putida</i> 7 ; 0,54	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> spp. <i>denitrificans</i>		-
FTJ	<i>Xanthomonas</i> sp. 400.000 ; 0,98			
FTK	<i>Pseudomonas putida</i> ou <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ou <i>Pseudomonas fluorescens</i>			- 30 mm
FTM			<i>Staphylococcus saprophyticus</i> 86,4%	

Tableau VI.2.3.3-a : Bilan des différentes étapes d'identification des souches isolées du consortium FT.

Nous avons fait une observation en microscopie électronique à balayage (cf. protocole en ANNEXE 2-b) de 2 des souches présentes dans le consortium FT : FTC, bacille Gram-négatif identifié comme un *Pseudomonas aeruginosa*, et FTM, cocci Gram-positif identifié comme un *Staphylococcus saprophyticus*.

A) *Staphylococcus saprophyticus* FTM



B) *Pseudomonas aeruginosa* FTC

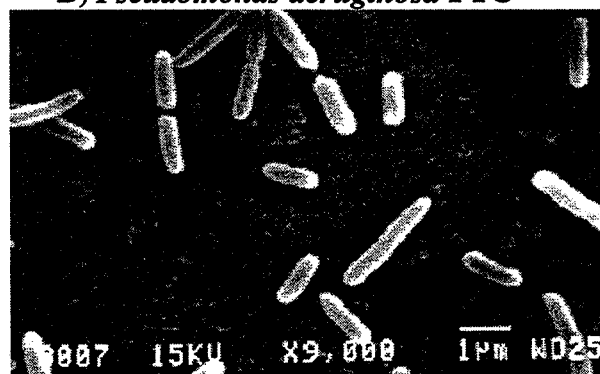


Figure VI.2.3.3-a : Observation en microscopie électronique à balayage des souches de *Staphylococcus saprophyticus* FTM (A) et de *Pseudomonas aeruginosa* FTC (B).

Nous observons des bâtonnets de 1mm de long pour environ 0,3 mm de diamètre pour FTC, et des cocci bien ronds d'environ 0,9 mm de diamètre pour FTM (Figure VI.2.3.3-a).

**VI.2.3.4 - Consortium PY**

17 souches ont été isolées dont une est Gram+, **PYL** (Tableaux VI.2.3.4-a et -b).

Les caractères des souches constituant le consortium PY sont détaillés en ANNEXE 11.

Ce consortium a été celui pour lequel il a été le plus difficile d'isoler les souches et semble donc le plus complexe des consortia parmi FT, AT, PT et PY.

	BBL CRYSTAL E/NF	API20NE	Rapid NFplus	MicroScan Neg/Urine Combo Type 5I ou Neg Combo Type 4I	MicroScan Pos Combo Type 4I	Mobilité Pousse à 42°C (+ ou-) Ø C390
<b>PYA</b>	<i>Ps. aeruginosa</i>					+ 0 mm
<b>PYB</b>	<i>Ps. aeruginosa</i> 1548 ; 0,88					Mobile - 0 mm
<b>PYC</b>	<i>Ps. paucimobilis</i>	Jaune				
<b>PYD1</b>	<i>Ps. aeruginosa</i> ou <i>Ps. putida</i>					+ Léger halo Mobile
<b>PYD2</b>	<i>Ps. putida</i> 0,72	<i>Alc. denitrificans</i> 93,6%				Mobile -
<b>PYD3</b>	<i>Ps. putida</i> 169 ; 0,8	<i>Ps. putida</i> 99,9%				Mobile -
<b>PYE</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>					
<b>PYF</b>	<i>Fl. odoratum</i> 306 ; 0,48 ou <i>Ps. putida</i> 448 ; 0,26	CDC groupe IV C-2 59%				Immobile
<b>PYG</b>	<i>Ps. aeruginosa</i> 45 ; 0,99					+ 0 mm
<b>PYH</b>	<i>Fl. odoratum</i> ou <i>Ps. putida</i>	CDC groupe IV C-2 59%	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> ou <i>Shewenella putrefaciens</i>			Mobile
<b>PYI</b>	?	?		<i>Enterobacter cloacae</i>		
<b>PYJ</b>	<i>Ps. aeruginosa</i> ou <i>Ps. putida</i>					+ Léger halo
<b>PYL</b>					<i>Staphylococcus capitis</i> 96%	

**Tableau VI.2.3.4-a** : Bilan des différentes étapes d'identification des souches isolées (1<sup>ère</sup> partie) du consortium PY.

**PYA**, **PYB**, **PYG** et **PYJ** ont été identifiées comme des *Pseudomonas aeruginosa* dans le système BBL Crystal E/NF ; elles ont toutes des morphologies différentes.

**PYB** ne pousse pas à 42°C, mais résiste au C390 (diamètre nul) : il s'agit très certainement d'un *Pseudomonas aeruginosa*, mais avec un comportement un peu atypique car son origine n'est pas clinique, mais tellurique.

**PYI** est immobile, donc il s'agit plutôt d'un *Stenotrophomonas maltophilia*.

	BBL CRYSTAL E/NF	API20NE	Rapid NFplus	MicroScan Neg/Urine Combo Type 5I ou Neg Combo Type 4I	MicroScan Pos Combo Type 4I	Mobilité Pousse à 42°C (+ ou-) Ø C390
<b>PYM</b>	<i>Ps. putida</i> ou <i>Ps. fluorescens</i>	? GEL -	Cette souche est GEL- en API20NE, il ne s'agit donc pas de <i>Ps. fluorescens</i> . Mobile			
<b>PYN</b>	Bacille gram-	<i>Ps. test/alc</i> 79,8% <i>Alc. den.</i> 17,2%	<i>Flavobacterium</i> IIb, niveau de résultat douteux			Immobile
<b>PYO</b>	<i>Ps. paucimobilis</i> >25.10 <sup>6</sup> ; 0,99		<i>Flavobacterium</i> IIb, niveau de résultat douteux	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> (jaune pâle) 58,8% ou <i>Flavobacterium indologenes</i> (jaune) 41,1%	Cette souche est très jaune.	Immobile
<b>PY1</b>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 1055 ; 0,73					Immobile

**Tableau VI.2.3.4-b** : Bilan des différentes étapes d'identification des souches isolées (2<sup>ème</sup> partie) du consortium PY.

**PYO** est immobile et d'un jaune affirmé (pas pâle), il s'agit donc plutôt de *Flavobacterium indologenes*, mais cela resterait à confirmer car la probabilité n'est pas bonne.

**PYN** est immobile, donc il s'agit sans doute d'un *Flavobacterium*, mais cela reste aussi à confirmer.

#### VI.2.3.5 – Bilan global

Respectivement 18, 3, 9, 5, 3, 3 et 1 souches appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Staphylococcus* et *Micrococcus* ont été mises en évidence dans les consortia FT, PT, PY et AT (Tableau VI.2.3.5-a).

Dans ces Tableaux, nous avons donné les résultats des meilleures identifications (probabilités) des Tableaux VI.2.3.1-a, VI.2.3.2-a, VI.2.3.3-a et VI.2.3.4-a et les systèmes d'identification correspondants.

Nous avons procédé à une reconstitution d'inoculum avec les souches isolées à partir des consortia : par exemple, pour PT, nous avons réuni toutes les souches isolées à partir de PT. Nous avons alors inoculé du milieu contenant respectivement du fluoranthène, de l'anthracène, du phénanthrène et du pyrène avec les "consortia" FT, AT, PT et PY ainsi reconstitués.

Aucune croissance ou modification dans l'aspect des cultures n'a été observée : soit le (ou les) caractère a été perdu, soit toutes les souches n'ont pas été isolées. Une combinaison de ces deux suppositions est sans doute plus que probable.

SOUCHES IDENTIFIÉES SELON		LES METHODES SUIVANTES
PTA	<i>Enterobacter cloacae</i>	MicroScan Neg /Urine Combo Type 5I
PTB	<i>Pseudomonas putida</i>	API20NE
PTC	<i>Pseudomonas putida</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PTD	<i>Flavobacterium</i> Ilb ?	BBL CRYSTAL E/NF , API20NE
PTEb	Bacille Gram- quelconque	BBL CRYSTAL E/NF
PTEt	Bacille Gram- quelconque	BBL CRYSTAL E/NF
PTF1	CDC groupe IV C-2	API20NE
PTF2	<i>Brevibacterium diminuta</i>	Rapid NFplus system
PTG1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MicroScan Pos Combo Type 4I
PTG3	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Rapid NFplus system
PTJ	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	API20NE
ATA	<i>Pseudomonas diminuta</i>	BBL CRYSTAL E/NF
ATB	<i>Brevibacterium diminuta</i>	Rapid NFplus system
ATC	<i>Flavobacterium odoratum</i>	Rapid NFplus system
ATD	<i>Micrococcus kristinae</i>	MicroScan Pos Combo Type 4I
ATE	<i>Flavobacterium odoratum</i>	Rapid NFplus system
ATF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
ATG	<i>Pseudomonas putida</i>	BBL CRYSTAL E/NF
ATH	<i>Enterobacter cloacae</i>	MicroScan Neg /Urine Combo Type 5I
ATJ	sans doute <i>Flavobacterium odoratum</i>	Rapid NFplus system
FTA	<i>Flavobacterium multivorum</i>	API20NE
FTB	<i>Pseudomonas putida</i>	API20NE
FTC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
FTF	<i>Flavobacterium</i> sp.	BBL CRYSTAL E/NF
FTG	<i>Flavobacterium</i> sp	BBL CRYSTAL E/NF
FTI	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> spp. <i>denitrificans</i>	API20NE
FTJ	<i>Xanthomonas</i> sp.	BBL CRYSTAL E/NF
FTK	sans doute <i>Pseudomonas putida</i>	BBL CRYSTAL E/NF
FTM	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	MicroScan Pos Combo Type 4I
PYA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYC	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYD1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYD2	<i>Alcaligenes denitrificans</i>	API20NE
PYD3	<i>Pseudomonas putida</i>	API20NE
PYE	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYF	CDC groupe IV C-2	API20NE
PYG	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYH	<i>Alcaligenes xylosoxydans</i> ou <i>Shewenella putrefaciens</i>	Rapid NFplus system
PYI	<i>Enterobacter cloacae</i>	MicroScan Neg /Urine Combo Type 5I
PYJ	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BBL CRYSTAL E/NF
PYL	<i>Staphylococcus capitis</i>	MicroScan Pos Combo Type 4I
PYM	<i>Pseudomonas putida</i>	BBL CRYSTAL E/NF avec GEL-
PYN	<i>Flavobacterium</i> Ilb ?	Rapid NFplus system
PYO	<i>Flavobacterium indologenes</i>	MicroScan Neg Combo Type 4I
PY1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	BBL CRYSTAL E/NF

Tableau VI.2.3.5-a : Bilan final des identifications menées sur les souches isolées à partir des consortia PT, AT, FT et PY (espèce et mode d'identification).

## VI.2.4 – Cohérence des identifications et possibilités de risques

### VI.2.4.1 – La famille des *Pseudomonadaceae*

Les pseudomonads (*Pseudomonas* et *Xanthomonas* ici) représentent 47%, soit la majorité relative des souches isolées.

En effet, de nombreux matériaux naturels en sont des sources. Dans certains habitats, elles peuvent représenter une minorité de la flore microbienne totale, mais sous certaines conditions (pH proche de la neutralité, matière organique en solution, température mésophile, bon apport en oxygène dissous), leur croissance rapide en l'absence de facteurs de croissance (Krieg and Holt, 1984) complexes décide de leur prédominance. Les *Pseudomonas* fluorescentes saprophytes sont très communes dans les sols et abondent aussi dans la rhizosphère où elles semblent avoir un effet stimulant sur la croissance des plantes. Une prédominance de *Pseudomonas maltophilia* (maintenant reclassée en *Stenotrophomonas*) par rapport aux autres pseudomonads existe dans les rhizosphères de différentes plantes cultivées, alors que, sur 23 souches issues du sol, 22 étaient identifiées comme des *Pseudomonas putida* (Krieg and Holt, 1984).

Ainsi, des *Pseudomonas aeruginosa* peuvent être isolées du sol et de l'eau, les *Pseudomonas putida* sont communément isolées du sol et de l'eau après enrichissement sur un milieu minéral contenant différentes sources de carbone, des *Pseudomonas diminuta* ont été isolées de l'eau et de spécimens cliniques (Krieg and Holt, 1984).

Parmi les pseudomonads, *Ps. mallei* et *Ps. pseudomallei* sont les seuls pathogènes. Mais d'autres espèces de *Pseudomonas* sont classées comme des pathogènes opportunistes à cause de leur faible pathogénicité envers des individus en bonne santé. *Pseudomonas aeruginosa* est actuellement le plus significatif de ces pathogènes opportunistes pour les sujets immunodéprimés. *Pseudomonas putida* est beaucoup moins prévalente dans les hôpitaux. *Ps. maltophilia* est la deuxième pseudomonad la plus prévalente dans les hôpitaux et est souvent associée à des processus infectieux sérieux (Krieg and Holt, 1984).

Tous les organismes appartenant au genre *Xanthomonas* sont des phytopathogènes (Krieg and Holt, 1984).

### VI.2.4.2 – La famille des *Flavobacterium*

Elle représente ici 20% des souches isolées. Il existe de nombreux isolats environnementaux qui poussent aux températures de 5°C à 30°C. Des souches proches de *Flavobacterium* IIb sont largement distribuées dans le sol et l'eau.

La pathogénicité (Krieg and Holt, 1984) pour l'homme des autres espèces que *Flavobacterium meningosepticum* est peu documentée, mais des cas de méningite, bactériémie et de colonisation des voies respiratoires supérieures de patients souffrant de pathologies graves ont été attribués au groupe IIb.

### VI.2.4.3 – La famille des *Alcaligenes*

Elle représente 11% des isolats.

Les *Alcaligenes* semblent ubiquitaires car elles ont été isolées du sol, de l'eau, des produits laitiers, de l'appareil digestif des vertébrés, des nématodes et des insectes. Des *Alcaligenes denitrificans* et *Alcaligenes faecalis* ont été isolées ainsi (Krieg and Holt, 1984). *Alcaligenes denitrificans* peut jouer un rôle dans les processus de dénitrification dans le sol.

Elles peuvent occasionnellement provoquer des infections opportunistes chez l'homme.

### VI.2.4.4 – La famille des *Enterobacteriaceae*

Elle représente 7% des isolats (un dans AT, un dans PT et un dans PY) et est dans tous les cas représentée ici par le genre *Enterobacter* et plus précisément l'espèce *Enterobacter cloacae*. Nous avons isolé 3 souches d'*Enterobacter cloacae*.

Cette espèce existe dans l'eau, les effluents, le sol, l'environnement hospitalier, la peau, l'appareil digestif humain et animal (bactérie commensale). Le genre des *Enterobacter* est largement distribué dans la nature, et il est commun chez l'homme et l'animal.

Ce n'est pas un pathogène entérique, mais il peut être un pathogène opportuniste.

#### VI.2.4.5 – La famille des *Micrococcaceae*

Elle représente 9% des isolats (3 souches, soit environ 7%, appartenant au genre *Staphylococcus* et 1 souche, soit environ 2%, au genre *Micrococcus*).

Les populations naturelles appartenant au genre *Staphylococcus* sont essentiellement associées à la peau, ses glandes et les muqueuses des animaux à sang chaud.

Pour les trois *Staphylococcus* isolés ici (*epidermidis*, *capitis*, *saprophyticus*), l'habitat majeur est l'homme, mais des organismes peuvent être isolés d'une variété de produits animaux (viande, lait, fromage) et de sources environnementales (sol, sable, poussière, air, eaux naturelles).

*Staphylococcus epidermidis* est un pathogène opportuniste ; les patients immuno-déprimés sont particulièrement exposés à une infection par cette espèce. *S. capitis* est lui rarement associé à des infections, alors que *S. saprophyticus* est l'espèce de staphylocoques prédominante dans les infections urinaires aiguës chez les femmes adultes jeunes (Sneath et al., 1986).

L'habitat naturel primaire des *Micrococcus* est la peau des mammifères, leur habitat secondaire étant la viande et les produits laitiers, le sol et l'eau. Quelques souches sont des pathogènes opportunistes.

#### VI.2.4.6 – Comparaison entre consortia et avec la littérature

Il se dégage globalement 18 espèces différentes sur la totalité des 4 consortia (Tableau VI.2.4.6-a).

Le genre *Pseudomonas* est largement représenté (21 souches sur 46 isolées, soit 46% des isolats), essentiellement par les espèces *aeruginosa* et *putida* alors qu'il représente en général de 3 à 20% de la microflore indigène des sols. Nous avons déjà souligné cela dans la partie bibliographique au III.5.2.1 puisque ce genre est largement représenté dans l'étude de la biodégradation des HAP. Ainsi, on retrouve dans la bibliographie les espèces *paucimobilis* (Mueller et al., 1990), *putida*, *aeruginosa* (Trzesicka-Mlynarz and Ward, 1995), *fluorescens* (Caldini et al., 1995 ; Foght and Westlake, 1996), *cepacia* (Grifoll et al., 1995), *stutzeri*, *saccharophilia* (Stringfellow and Aitken, 1995), *vesicularis* (Weissenfels et al., 1990), et d'autres souches appartenant au genre *Pseudomonas*, mais dont l'espèce n'a pas été déterminée (Gray et al., 1994 ; Komatsu et al., 1993 ; Ashok et al., 1995 ; Volkering et al., 1992 ; Bouchez et al., 1995, 1996).

Nous retrouvons 3 *Flavobacterium* dans FT et 3 dans AT, contre 1 dans PT et 2 dans PY, ainsi que 1 *Alcaligenes* dans FT, 2 dans PT et 2 dans PY. Les *Alcaligenes* et les *Flavobacterium* sont également rencontrés dans les études de dégradation des HAP.

Ashok et al. (1995) ont ainsi mis en évidence 1 isolat appartenant au genre *Alcaligenes*, mais des souches d'*Alcaligenes eutrophus*, *Alcaligenes paradoxus* (Selifonov et al., 1993b), *Alcaligenes denitrificans* (Weissenfels et al., 1990, 1991) ont aussi été étudiées. Les *Flavobacterium* impliquées dans la dégradation des HAP sont plus rares, et seuls Trzesicka-Mlynarz and Ward (1995), dans notre bibliographie, ont relevé une souche appartenant au genre *Flavobacterium*.

Dans chaque consortium une seule souche Gram+ a été isolée, différente pour chacun : 3 *Staphylococcus* (*saprophyticus*, *epidermidis* et *capitis*) et 1 *Micrococcus kristinae*.

D'après les colorations de Gram réalisées sur les bouillons de culture de AT, PT, PY et FT (Figures VI.2.1-a et VI.2.1-b), ces bactéries Gram+ semblent essentielles dans la croissance des consortia AT, PY et FT sur respectivement l'anthracène, le pyrène et le fluoranthène mais d'importance moindre pour la croissance du consortium PT sur le phénanthrène (où seules des bactéries à Gram négatif sont mises en évidence).

Genre et/ou espèce	PT	AT	FT	PY
<i>Ps. putida</i>	B, C	G	B, K	D3, M
<i>Ps. aeruginosa</i>		F	C	A, B, D1, G, J
<i>Ps./Brev. diminuta</i>	F2	A, B		
<i>Ps. Paucimobilis</i>				C
<i>Xanth./ Steno.</i>			J	E,1
<b>Sous-Total</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>10</b>
<i>Fl. multivorum</i>			A	
<i>Fl. sp.</i>			F, G	
<i>Fl. odoratum</i>		C, E, J		
<i>Fl. indologenes</i>				O
<i>Fl. I1b</i>	D			N
<b>Sous-Total</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<i>Alc. xylosoxydans</i>			I	H
<i>Alc. faecalis</i>	G3			
<i>Alc. denitrificans</i>	J			D2
<b>Sous-Total</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	H		I
<b>Sous-Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
CDC groupe IV C-2	F1			F
Bacille Gram- quelconque	Eb, Et			
<b>Sous-Total</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<i>Staphylococcus</i>	G1		M	L
<i>Micrococcus</i>		D		
<b>Sous-Total</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>17</b>

Tableau VI.2.4.6-a : Bilan par famille des résultats d'identification des souches composant les consortia FT, PT, PY et AT.

Dans notre bibliographie, les bactéries Gram+ mises en évidence dans les études de biodégradation des HAP appartiennent essentiellement aux genres *Rhodococcus* (Bouchez et al., 1996 ; Walter et al., 1991) et *Mycobacterium* (Gray et al., 1994 ; Boldrin et al., 1993 ; Heitkamp et al., 1988a) mais on trouve aussi des souches appartenant aux genres *Micrococcus* (Ashok et al., 1995) et *Staphylococcus* (Monna et al., 1993).

### VI.2.5 – Bilan sur les identifications

Notre protocole de sélection nous a donc permis de sélectionner uniquement des bactéries, toutes aérobies. Les consortia sélectionnés sur des sources de carbone différentes sont composés de micro-organismes différents, mais nous retrouvons les mêmes familles dans les quatre consortia PT, FT, PY et AT.

Les pourcentages (Tableau VI.2.5-a) de chaque famille dans la composition des consortia sont assez comparables : 10% pour les *Micrococaceae*, de 30 à 60% pour les *Pseudomonadaceae*

(avec une moyenne de 45%). La famille des *Flavobacterium* représente 10% des souches pour PT et PY, 33% pour FT et AT ; les *Enterobacteriaceae* représentent 10% environ des souches pour les consortia AT, PT et PY.

Ainsi, les familles mises en évidence sont en accord avec les références trouvées dans notre littérature : *Pseudomonadaceae*, *Micrococcaceae*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*. Seule la famille des *Enterobacteriaceae* n'a pas été reportée dans notre littérature.

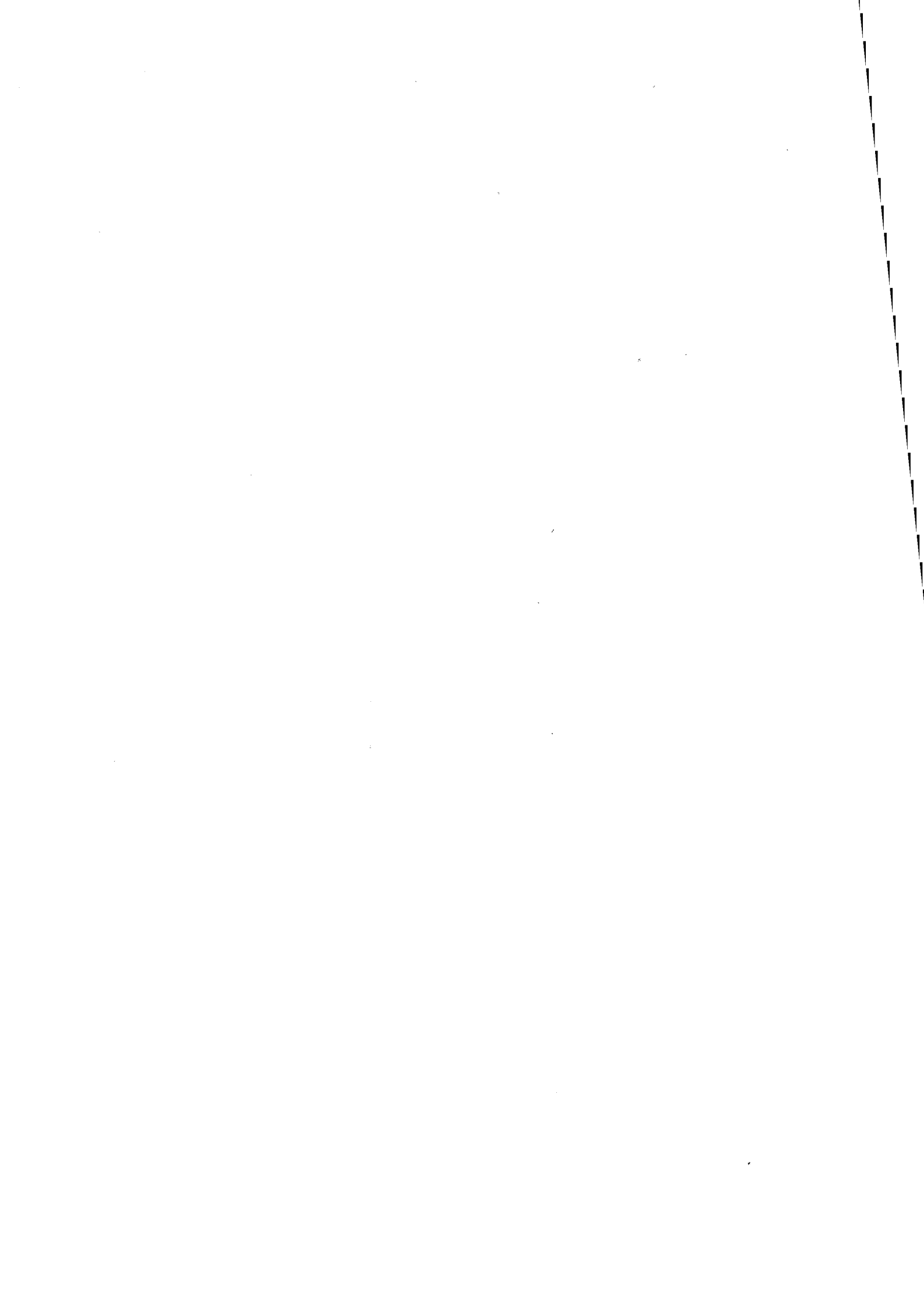
Famille	FT	AT	PT	PY
<i>Pseudomonadaceae</i>	44%	44%	30%	59%
<i>Flavobacterium</i>	33%	33%	10%	12%
<i>Alcaligenes</i>	11%	0%	20%	12%
<i>Enterobacteriaceae</i>	0%	11%	10%	6%
Inconnue (gram-)	0%	0%	30%	6%
<i>Micrococcaceae</i>	11%	11%	10%	6%

Tableau VI.2.5-a : Proportions des différentes familles dans chaque consortium sélectionné.

Nous avons vu au VI.2.4 que toutes les souches isolées peuvent effectivement avoir une origine environnementale (le sol, ici). En outre, aucun des isolats n'est un pathogène (sauf opportuniste, ce que sont la plupart des bactéries). Cela nous rassure quant à leur manipulation et leur utilisation.

Nous n'avons trouvé ni *Arthrobacter*, ni *Bacillus* qui représentent pourtant chacun respectivement 5 à 60%, 7 à 67% de la microflore du sol (cf. I.2.1). Par contre, alors que les *Pseudomonas* en représentent de 3 à 20%, nous en avons isolé 21 souches sur 46 isolées soit 46%. En fait, les protocoles de sélection modifient les rapports entre micro-organismes et donc les proportions sont modifiées et les *Pseudomonas* sont connues pour être impliquées dans de nombreux processus de dégradation





## **CHAPITRE VII : ETUDE EN BATCH DES CONSORTIA SUR DIFFERENTES SOURCES CARBONEES**

Après avoir sélectionné les différents consortia décrits au VI, nous avons cherché à étudier leur comportement envers les différents HAP utilisés dans notre étude. En effet, notre but final est d'avoir des micro-organismes capables d'améliorer des processus de biodégradation des HAP dans des sols pollués où la pollution est constituée de mélanges de HAP.

Ainsi, il sera plus intéressant pour nous d'utiliser des micro-organismes capables de dégrader plusieurs HAP, i.e. plutôt aspécifiques.

Aussi, nous avons cherché à étudier la capacité des consortia sélectionnés à utiliser différents HAP comme seule source carbonée, à évaluer leurs performances les uns par rapport aux autres. Nous avons également cherché à évaluer les similarités d'utilisation des HAP par les différents consortia.

### **VII.1 – Première exposition aux sources carbonées**

Nous nous situons dans les mêmes conditions de croissance (vitesse d'agitation, quantité de HAP, volumes) qu'au VI.1.2 pour la mise en évidence de la sélection, mais l' $Abs_{600nm}$  initiale est de 0,1 et l'inoculum est poussé sur bouillon nutritif sur la nuit avant l'ensemencement pour obtenir un inoculum suffisant.

Les Figures VII.1.1.1-a, VII.1.1.2-a, VII.1.1.3-a et VII.1.1.4-a illustrent la croissance des différents consortia PT, AT, FT et PY sur d'autres sources carbonées (HAP) que leur HAP de sélection. Dans tous les cas, aucune croissance n'était observée dans les témoins MSM+inoculum et MSM+HAP non inoculés.

#### **VII.1.1 – Croissance**

##### **VII.1.1.1 – Consortium PT**

Après une phase de latence de 120 jours, un début de croissance de PT semble apparaître sur l'anthracène (Figure VII.1.1.1-a).

Les essais réalisés sur le fluoranthène et le pyrène mettent en évidence des phases de latence de respectivement 10 jours et 40 jours, ainsi que l'existence de phases exponentielles de croissance (grâce à la représentation en coordonnées semi-logarithmiques) entre respectivement 25 et 80 jours, 60 et 100 jours.

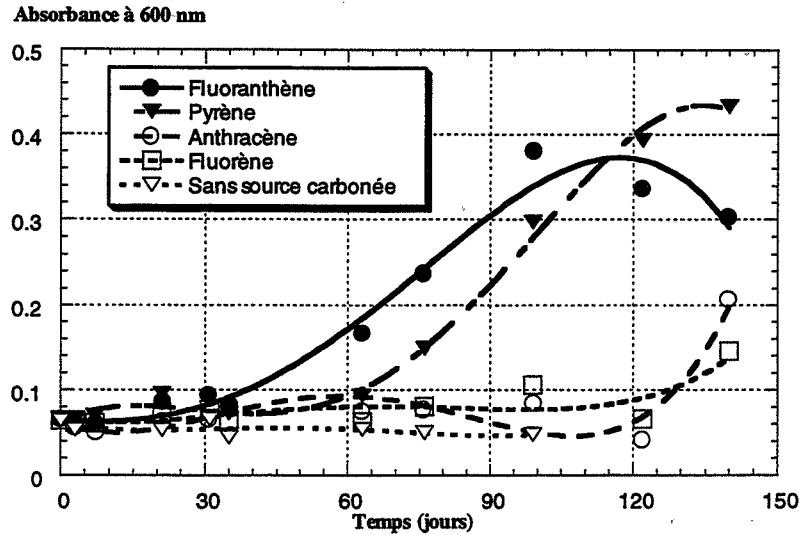


Figure VII.1.1.1-a : Courbes de croissance du consortium PT sur le fluoranthène, le pyrène, l'anthracène et le fluorène comme seules sources de carbone.

VII.1.1.2 – Consortium AT

AT peut croître sur le fluoranthène, le phénanthrène et le pyrène avec des phases de latence de respectivement 20 jours, entre 3 et 7 jours et 20 jours (Figure VII.1.1.2-a).

Les courbes de croissance sur le fluoranthène et le pyrène présentent une portion linéaire de 25 à 100 jours.

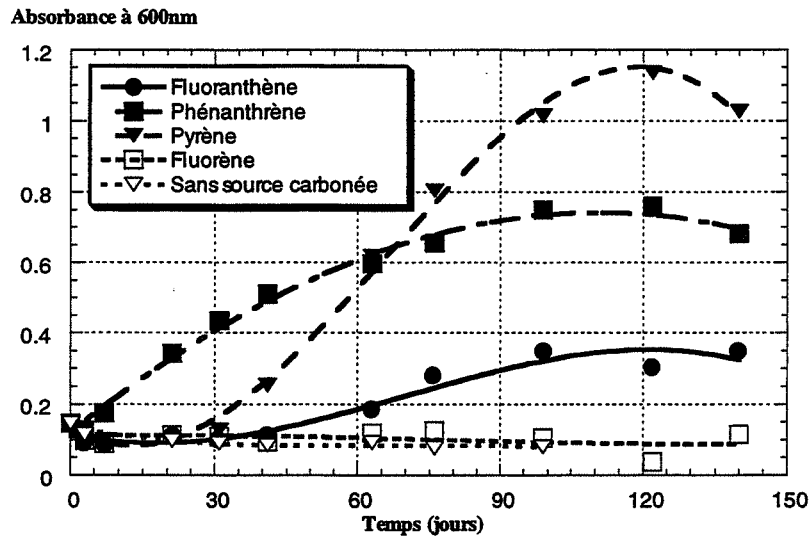


Figure VII.1.1.2-a : Courbes de croissance du consortium AT sur le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène et le fluorène comme seules sources de carbone.

VII.1.1.3 – Consortium FT

Le consortium FT peut utiliser le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène comme unique source carbonée pour sa croissance (Figure VII.1.1.3-a).

Des phases de latence de 30 jours sont mises en évidence sur le pyrène et l'anthracène, alors qu'elle est inférieure à 3 jours sur le phénanthrène.

Des zones linéaires de croissance de FT existent sur ces trois sources carbonées (Figure VII.1.1.3-a), puis une phase stationnaire est atteinte. En représentation semi-logarithmique, aucune zone linéaire, donc correspondant à une phase de croissance exponentielle, ne peut être mise en évidence.

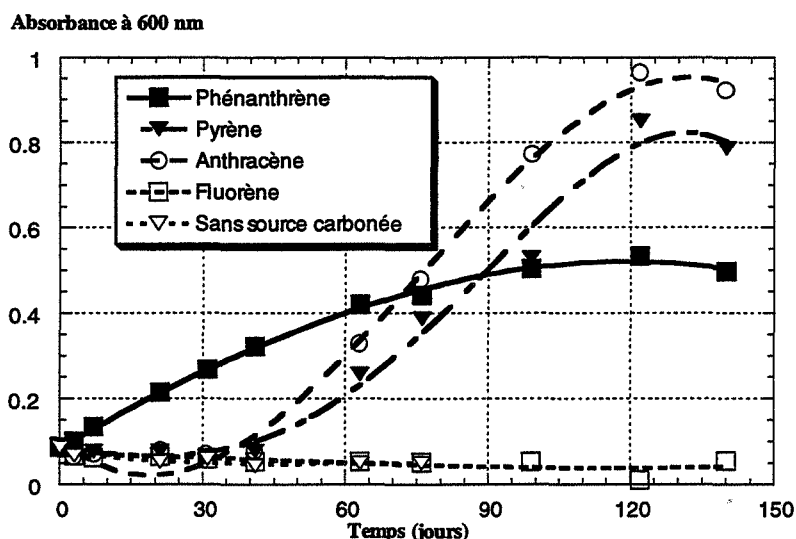


Figure VII.1.1.3-a : Courbes de croissance du consortium FT sur le phénanthrène, le pyrène, l'anthracène et le fluorène comme seules sources de carbone.

#### VII.1.1.4 – Consortium PY

Le consortium PY peut utiliser le fluoranthène, le phénanthrène et l'anthracène comme sources de carbone, mais pas le fluorène (Figure VII.1.1.4-a). La phase de latence est inférieure à 3 jours (deuxième point de mesure) sur le phénanthrène, alors qu'elle dure 7 jours sur l'anthracène et 20 jours sur le fluoranthène.

Des phases linéaires de croissance sont mises en évidence sur le phénanthrène, l'anthracène et le fluoranthène.

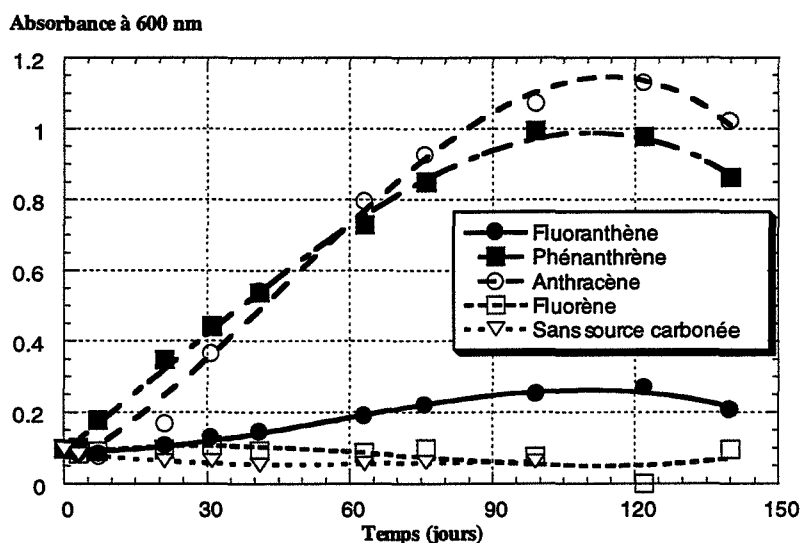


Figure VII.1.1.4-a : Courbes de croissance du consortium PY sur le fluoranthène, le phénanthrène, l'anthracène et le fluorène comme seules sources de carbone.

#### VII.1.1.5 – Consortium FN

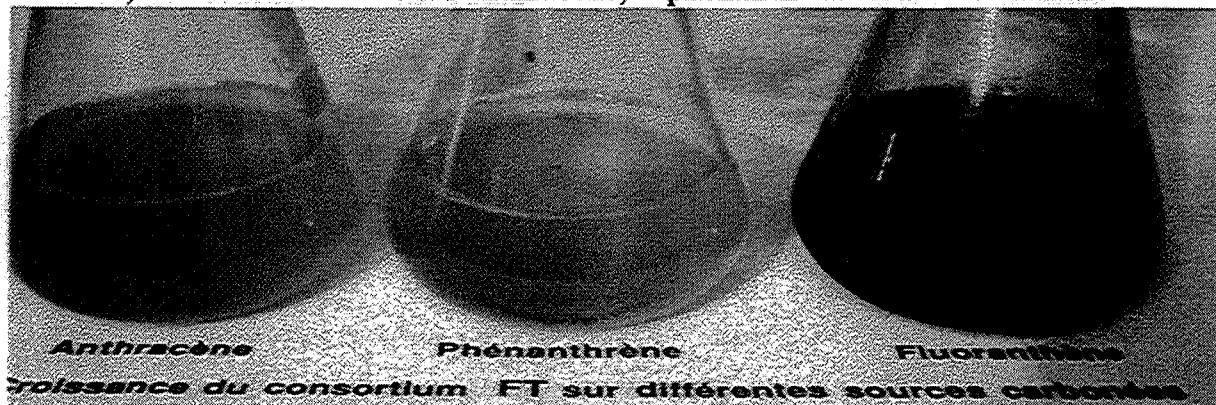
Le consortium FN peut croître sur le phénanthrène (aucune phase linéaire ou exponentielle de croissance n'étant mise en évidence), mais pas sur le fluoranthène, l'anthracène ou le pyrène. La courbe de croissance n'est pas donnée ici.

Aussi, FN est beaucoup plus spécifique que FT, PT, PY et AT en ce qui concerne l'utilisation de différents HAP comme source de carbone.

### VII.1.2 – Aspect des cultures de PT, AT, FT et PY

Les cultures des consortia PT, AT, FT et PY réalisées en fioles d'Erlenmeyer sur les différentes sources carbonées que sont le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène, l'anthracène et le fluorène ont des aspects caractéristiques qui sont fonction des HAP utilisés.

#### A) Croissance de FT sur l'anthracène, le phénanthrène et le fluoranthène



#### B) Croissance de AT sur l'anthracène, le phénanthrène et le fluoranthène

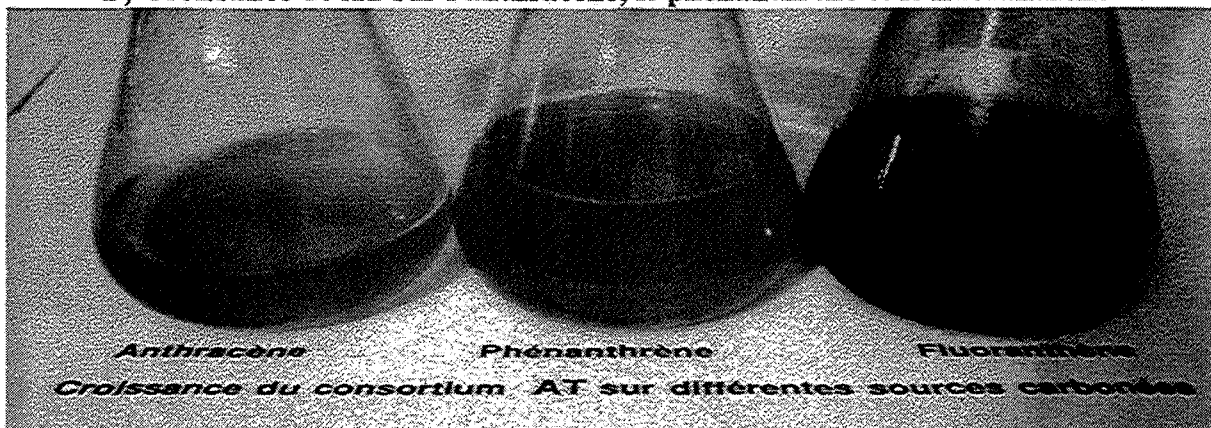


Figure VII.1.2-a : Aspect de cultures en fioles d'Erlenmeyer sur anthracène, phénanthrène et fluoranthène. A) consortium FT ; B) consortium AT.

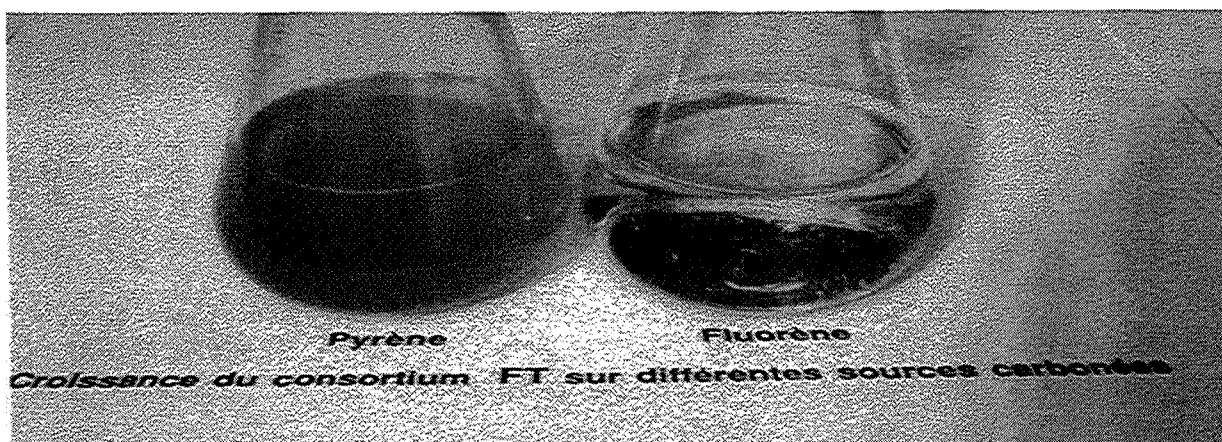


Figure VII.1.2-b : Aspect de cultures en fioles d'Erlenmeyer de FT sur le pyrène et le fluorène.

En fait, pour un HAP donné, les aspects extérieurs des cultures des différents consortia sont similaires, voire identiques.

La Figure VII.1.2-a est constituée de 2 photographies des cultures de FT et AT sur l'anthracène, le phénanthrène et le fluoranthène.

Les cultures de PT et PY sur le pyrène et l'anthracène ont des aspects semblables à ceux de FT et AT. Par contre, sur le fluoranthène, la coloration observée pour PT est un marron « brillant » prononcé.

Nous remarquons donc bien la similarité de l'aspect des cultures pour un HAP donné, les cultures sur pyrène ayant la même couleur que sur l'anthracène, i.e. un aspect rose-orangé, alors que la coloration est un brun-marron sur le fluoranthène, et un opaque indéfinissable pour le phénanthrène.

La Figure VII.1.2-b montre que la culture du consortium FT sur le fluorène mène à l'obtention d'une coloration jaune vif, bien qu'aucune croissance de FT (prise de biomasse) n'ait été mesurée sur le fluorène. Il en est de même pour PT, mais pas pour PY, ni AT. Cela signifie qu'une biotransformation a lieu, qui n'est pas une assimilation cellulaire.

### VII.1.3 – Spectres d'absorption UV-visible au bout de 140 jours de culture

Les Figures VII.1.3.1-a à VII.1.3.5-a présentent les spectres d'absorption UV-visible des surnageants des cultures de FT, PT, PY, AT et FN sur les différentes sources carbonées, après 140 jours de culture. Dans tous les cas, nous avons inclus dans les Figures le spectre à 140 jours du témoin MSM+HAP non inoculé.

#### VII.1.3.1 - Source carbonée : phénanthrène

Sur le phénanthrène, tous les spectres sont différents de celui du témoin, les spectres de FT, FN et PY ayant exactement le même profil (Figure VII.1.3.1-a).

Ce profil est d'ailleurs identique à celui observé pour PT sur le phénanthrène à la Figure VI.1.2.2-a.

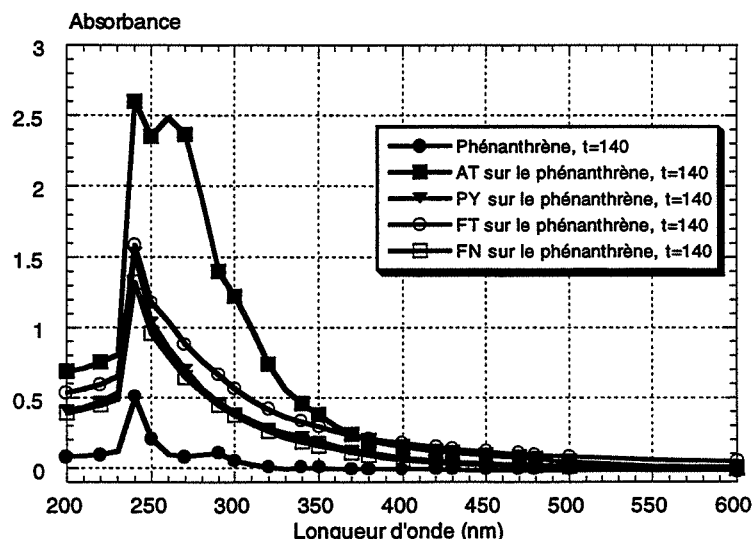


Figure VII.1.3.1-a : Spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture à 140 jours de AT, PY, FT, FN et du témoin non inoculé sur le phénanthrène.

Seul le spectre de AT à 140 jours a un profil différent : soit les composés produits au cours de la consommation du phénanthrène sont différents, soit nous sommes ici à un stade de

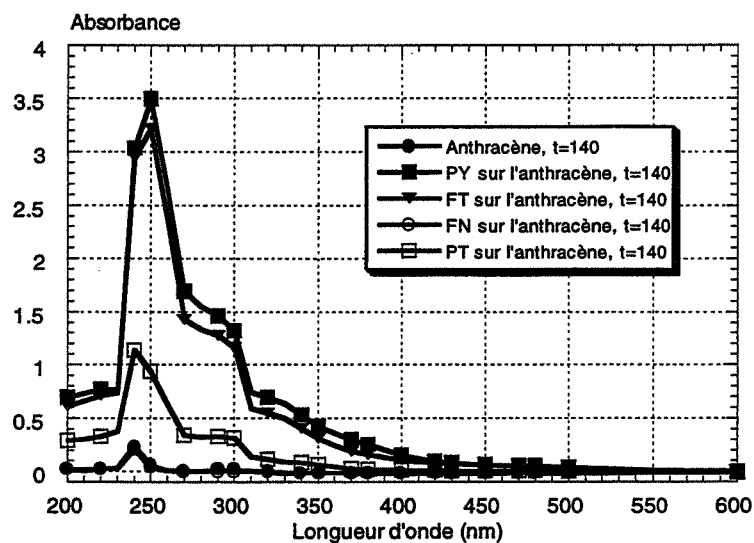
dégradation non encore atteint dans les expériences précédentes (les absorbances observées sont bien plus élevées avec AT). L'absorbance à 300 nm des surnageants des cultures sur phénanthrène semble un bon choix de longueur d'onde pour suivre l'apparition de nouveaux composés dans les surnageants des cultures sur le phénanthrène.

#### VII.1.3.2 - Source carbonée : anthracène

Pour l'anthracène (Figure VII.1.3.2-a), FN est identique au contrôle, alors que les spectres de PY, FT et PT s'apparentent bien aux spectres décrits pour AT sur l'anthracène à la Figure VI.1.2.2-a. Ainsi, PT à 140 jours ici (Figure VII.1.3.2-a) a un aspect semblable à celui de AT à 14 jours dans la Figure VI.1.2.2-a, alors que PY et FT ont des spectres à 140 jours sur l'anthracène semblables plutôt à l'aspect de AT à 55 jours à la Figure VI.1.2.2-a.

Les composés produits par FT, PT, PY et AT sur l'anthracène ont donc de grandes chances d'être identiques, et leurs proportions aussi. Les temps d'observation sont plus longs pour les spectres de la Figure VII.1.3.2-a car une période d'adaptation à la dégradation de l'anthracène a sans doute cette fois existé.

Les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture sur l'anthracène présentent également un épaulement vers 300 nm.



**Figure VII.1.3.2-a :** Spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture à 140 jours de PY, FT, FN, PT, et du témoin non inoculé sur l'anthracène.

#### VII.1.3.3 - Source carbonée : fluoranthène

Ainsi, pour la croissance sur le fluoranthène, FN et le contrôle à 140 jours sont identiques, ce qui nous confirme que FN ne croît pas sur le fluoranthène, mais aussi qu'aucune biotransformation n'a lieu.

En ce qui concerne AT, PT et PY, une modification nette des spectres par rapport au témoin est mise en évidence (Figure VII.1.3.3-a), ce qui confirme les observations faites au VII.1.1 et VII.1.2.

Un épaulement à 300 nm est observable sur les spectres, en particulier celui de AT.

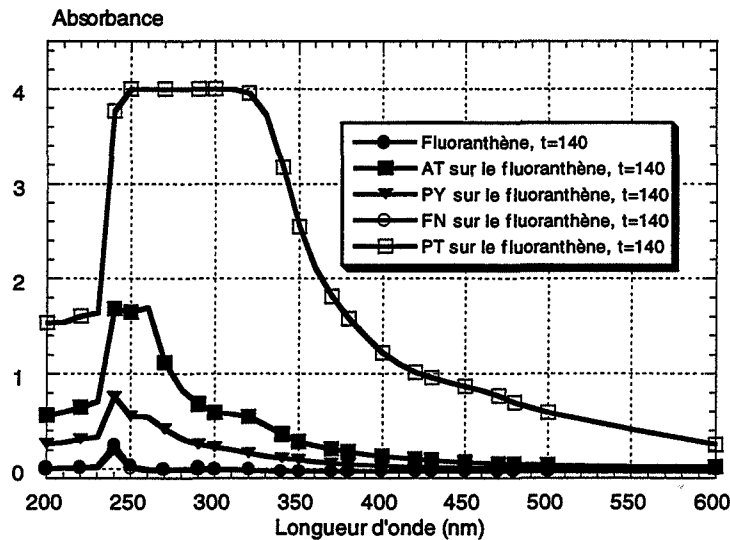


Figure VII.1.3.3-a : Spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture à 140 jours de AT, PY, FN, PT et du témoin non inoculé sur le fluoranthène.

#### VII.1.3.4 - Source carbonée : pyrène

Pour le pyrène, FN ne se détache pas du contrôle alors que AT, FT et PT ont des spectres bien différents du contrôle (Figure VII.1.3.4-a). Les absorbances maximales ne sont pas égales, mais des profils identiques apparaissent (mêmes épaulements notamment), qui correspondent d'ailleurs au profil d'absorption de PY sur le pyrène décrit à la Figure VI.1.2.2-a. Les composés produits au cours de l'utilisation du pyrène par les 4 consortia FT, PT, PY et AT sont sans doute identiques et en proportions similaires.

Les spectres d'absorption présentent un léger épaulement à 300 nm.

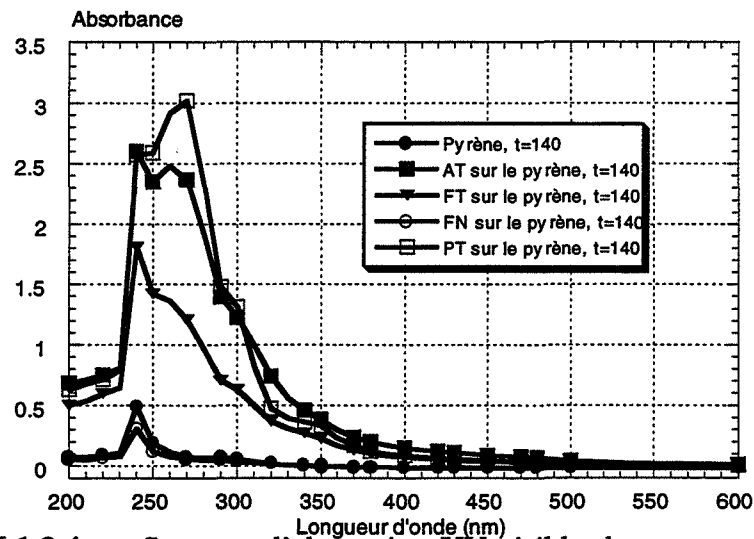


Figure VII.1.3.4-a : Spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture à 140 jours de AT, FT, FN, PT, et du témoin non inoculé sur le pyrène.

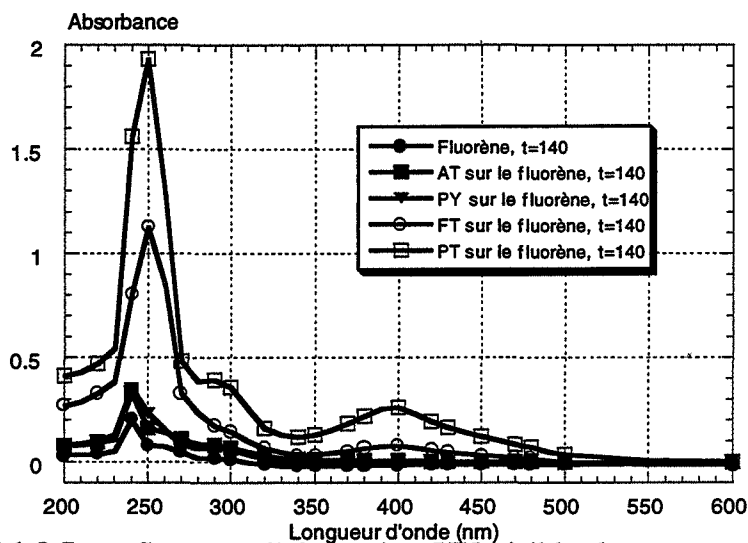
#### VII.1.3.5 - Source carbonée : fluorène

Enfin, nous avons également étudié les spectres d'absorption UV-visible des surnageants des cultures de AT, PY, FT et PT sur le fluorène (Figure VII.1.3.5-a).

Nous constatons bien que les spectres de AT et PY sont identiques à ceux du contrôle, alors que de fortes modifications spectrales apparaissent pour FT et PT. Nous n'avons pas noté de croissance significative de la biomasse par la mesure de l'absorbance à 600 nm dans



ces deux cas, mais une biotransformation était mise en évidence par l'apparition d'une coloration jaune vif des cultures en fioles d'Erlenmeyer.



**Figure VII.1.3.5-a : Spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture à 140 jours de AT, PY, FT, PT, et du témoin non inoculé sur le fluorène.**

Ainsi, les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture de PT et FT sur le fluorène sont identiques, avec un maximum local à 400 nm, ce spectre n'ayant pas été observé précédemment quand les sources carbonées étaient le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène ou l'anthracène.

#### VII.1.4 – Observation des cultures au microscope optique

A chaque prélèvement du suivi des cultures, nous avons procédé à une coloration de Gram d'un échantillon de culture (Figures VII.1.4-a et VII.1.4-b).

Ainsi, pour une source carbonée donnée, les aspects sur lame sont identiques pour tous les consortia. En ce qui concerne les croissances sur anthracène, fluoranthène et pyrène, des cocci Gram+ sont majoritaires, alors que sur le phénanthrène, uniquement (ou presque) des bactéries (bacilles et cocci) Gram- sont observées.

Pour un consortium donné et différentes sources carbonées, l'aspect des mélanges bactériens en coloration de Gram est différent. Pour une source carbonée donnée et différents consortia, ces aspects sont semblables.

Cela nous rappelle les observations faites sur les aspects des cultures en fioles d'Erlenmeyer, mais aussi sur les spectres d'absorption UV-visible des surnageants des cultures : la source carbonée détermine ici la biotransformation plus que le consortium utilisé.

Nous avons également observé ces consortia en microscopie électronique à balayage (protocole décrit en ANNEXE 2-b). Nous visualisons de cette façon les bactéries de manière individuelle à un grossissement de 9000.

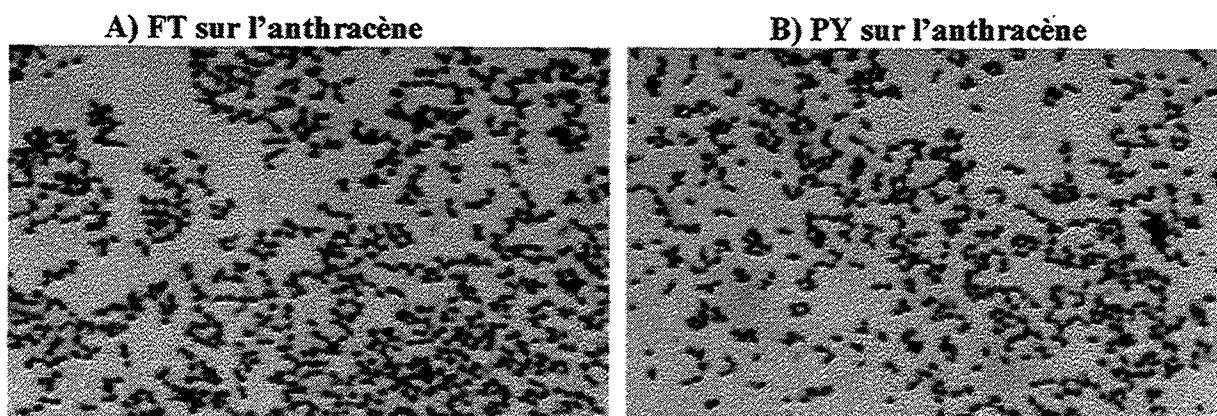


Figure VII.1.4-a : Aspect sur lame (x1000) en coloration de Gram des cultures FT sur anthracène (A) et PY sur anthracène (B).

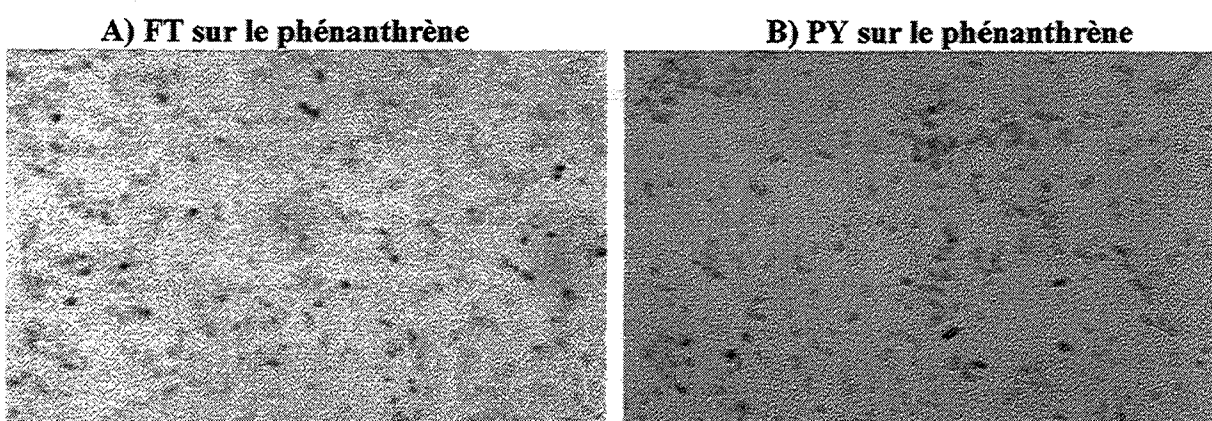


Figure VII.1.4-b : Aspect sur lame (x1000) en coloration de Gram des cultures FT sur phénanthrène (A), PY sur phénanthrène (B).

En ANNEXE 12, nous avons des photographies réalisées en microscopie électronique pour le consortium AT après culture sur le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène. Il n'est pas réellement possible de distinguer les différences entre les cultures du consortium sur ces différentes sources carbonées.

Nous distinguons des bacilles et des bactéries coccoïdes dans tous les cas. Il semble qu'un plus grand nombre de bacilles soit mis en évidence dans la culture de AT sur le phénanthrène, mais peut-être est-ce dû à un *a priori* de notre part.

Les bacilles ont des tailles de 1  $\mu\text{m}$  de long sur 0,5  $\mu\text{m}$  de large, les cocci des diamètres de 0,8  $\mu\text{m}$  environ.

### VII.1.5 – Bilan

Les résultats obtenus aux VII.1.1, VII.1.2 et VII.1.3 sont résumés dans le Tableau VII.1.5-a. Tenant compte du fait que chaque consortium est capable d'utiliser son HAP de sélection comme seule source de carbone, nous pouvons conclure du VII.1 que les consortia FT, PT, PY et AT peuvent tous les quatre utiliser le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène comme seule source de carbone.

Nous n'indiquerons pas dans le Tableau VII.1.5-a les phases de latence (vues au VI.1.3) des courbes de croissance des consortia sur leur HAP de sélection car les conditions d'exposition aux HAP seraient alors différentes. Par exemple, une croissance de FT sur le fluoranthène ne serait pas représentative d'une première exposition, à cause du mode de sélection des consortia, alors qu'une croissance sur phénanthrène, anthracène, pyrène ou

fluorène serait une première exposition. Les phases d'adaptation, donc de latence, ne seraient donc pas comparables. Nous pouvons faire des raisonnements similaires pour les autres consortia.

Le consortium FN n'étant capable d'utiliser que le phénanthrène et le fluorène comme source de carbone et ne semblant pas faire subir de biotransformation aux autres HAP étudiés, nous ne le considérerons plus dans la suite. En effet, cette spécificité le rend moins intéressant que les autres consortia pour des essais de biodégradation de mélanges de HAP.

Pour une même source carbonée, les aspects des cultures sur lame et en fioles d'Erlenmeyer, ainsi que les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture des différents consortia sont similaires. Les voies de dégradation et les produits obtenus au cours de l'utilisation des HAP par les micro-organismes ne dépendent sans doute que de la source carbonée, et non du consortium utilisé.

Le phénanthrène est la source carbonée sur laquelle le départ de la croissance des consortia est le plus rapide, i.e. la phase de latence la plus courte : moins de 5 jours pour tous les consortia. Cela n'est pas étonnant dans la mesure où le phénanthrène est décrit dans la littérature comme un des HAP les plus biodégradables (cf.III.5.2), surtout comparativement aux autres HAP utilisés ici.

La croissance du consortium PT présente des phases de latence de 10 jours sur le fluoranthène, 40 jours sur le pyrène et 120 jours sur l'anthracène. Il est paradoxal que l'adaptation de PT à l'utilisation de l'anthracène soit plus lente que celles du fluoranthène et du pyrène, car le phénanthrène et l'anthracène ont des structures tricycliques très voisines. Ce phénomène a déjà été rapporté par Trzesicka-Mlynarz and Ward (1995), qui l'ont attribué à la faible solubilité de l'anthracène par rapport à ces HAP.

Toutefois, cette explication n'est pas totalement suffisante.

		Fluoranthène	Phénanthrène	Pyrène	Anthracène	Fluorène
<b>Consortium PT</b>	Croissance	Oui, exp.		Oui, exp.	Faible	Non
	Temps de latence	10 jours		40 jours	120 jours	
	Coloration	Marron		Rose-orangé	Rose-orangé	Jaune vif
<b>Consortium AT</b>	Croissance	Oui, linéaire	Oui	Oui, linéaire		Non
	Temps de latence	20 jours	Entre 3 et 7 jours	20 jours		
	Coloration	Brun-marron	Opaque	Rose-orangé		
<b>Consortium FT</b>	Croissance		Oui, linéaire	Oui, linéaire	Oui, linéaire	Non
	Temps de latence		< 3 jour	30 jours	30 jours	
	Coloration		Opaque	Rose-orangé	Rose-orangé	Jaune vif
<b>Consortium PY</b>	Croissance	Oui, linéaire	Oui, linéaire		Oui, linéaire	Non
	Temps de latence	20 jours	< 3 jours		7 jours	
	Coloration	Brun-marron	Opaque		Rose-orangé	
<b>Consortium FN</b>	Croissance	Non	Oui	Non	Non	
	Temps de latence		< 3 jours			
	Coloration		Opaque			

**Tableau VII.1.5-a** : Bilan des essais de croissance des consortia PT, AT, FT, PY et FN sur différents HAP (sauf le HAP de sélection) comme seule source de carbone.

En effet, la phase de latence de la croissance de PY sur l'anthracène est de 7 jours contre 20 jours sur le fluoranthène. Or la solubilité aqueuse de l'anthracène est de 0,07 mg/l contre 0,26 mg/l pour le fluoranthène. L'ordre d'adaptation est donc là inversé par rapport aux solubilités aqueuses. D'autres phénomènes interviennent donc.

Des auteurs ont évoqué l'importance de la surface de contact des cristaux de HAP avec la phase aqueuse (Caldini et al., 1995 ; Stringfellow and Aitken, 1995), mais aussi des facteurs stériques et électroniques (Dingyi et al., 1996). Cela a été développé au III.5.2.1.

De même, les phases de latence de la croissance de FT sur le pyrène et l'anthracène sont de 30 jours, i.e. elles sont plutôt longues, alors que le pyrène et le fluoranthène ont des structures quadricycliques similaires et que l'anthracène n'a que 3 cycles.

AT présente aussi des phases de latence de 20 jours sur le fluoranthène et le pyrène. Or AT a été sélectionné sur un hydrocarbure tricyclique, mais s'adapte plus vite à l'utilisation de HAP à 4 cycles comme le fluoranthène et le pyrène, que FT sélectionné sur un hydrocarbure quadricyclique à l'utilisation de pyrène à 4 cycles et d'anthracène à 3 cycles.

En ce qui concerne le mode de croissance sur les différents HAP, des phases de croissance linéaires existent pour FT sur le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène, pour PY sur le phénanthrène et l'anthracène, pour AT sur le pyrène. Il y a donc sans doute limitation de la croissance par le taux de dissolution des HAP dans ces cas-là. Seul PT sur le fluoranthène et le pyrène présente des phases exponentielles de croissance.

C'est sans doute ici que les différences existant dans la composition microbienne des différents consortia interviennent le plus.

Les consortia FT et PT semblent faire subir au fluorène une biotransformation qui n'est pas une accumulation cellulaire car aucune croissance n'a été observée. En effet, une coloration jaune vif est visible dans les cultures en fioles d'Erlenmeyer dans ces deux cas. Or, un métabolite jaune vif du fluorène a été décrit par Grifoll et al. (1995). Ils n'ont pas réussi à l'isoler et à l'identifier.

Stringfellow and Aitken (1995) ont eux mis en évidence une réaction de cooxydation du fluorène en présence de peptone par une souche de *Ps. stutzeri*. Leur milieu de culture devenait jaune brillant. Par analyse CLHP couplée à la SM en ionisation par électrospray, ils ont identifié les 2 pics majeurs apparaissant dans le chromatogramme du surnageant comme la 9-hydroxyfluorénone et la 9-fluorénone.

Cette coloration et ces métabolites ont auparavant été décrits par Boldrin et al. (1993) et Monna et al. (1993). Ces derniers avaient utilisé une souche de *Staphylococcus auriculans*.

Nous avons donné au VII.1.3 les spectres d'absorption UV-visible des surnageants des cultures à 140 jours des différents consortia sur les différents HAP étudiés.

Ainsi, nous avons fait remarquer que l'absorbance à 300 nm des surnageants des cultures sur phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène semble un bon choix de longueur d'onde pour suivre l'apparition de nouveaux composés dans les surnageants de ces cultures. Pour le fluorène, le choix de l'absorbance à 400 nm semble plus judicieux.

Dans la suite, nous suivrons les modifications dans les surnageants de culture par la mesure des absorbances à ces longueurs d'onde (300 nm pour le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène, 400 nm pour le fluorène) plutôt que les spectres entiers, pour faciliter la lecture.

## VII.2 – Suivi de l'utilisation des HAP par spectrométrie d'émission de fluorescence

Putchá and Domach (1993) ont utilisé la spectrométrie d'émission de fluorescence comme moyen direct de suivi de la consommation de phénanthrène dans une solution de milieu minéral initialement à saturation. En effet, les HAP ont des propriétés de fluorescence et des spectres d'émission caractéristiques.

En outre, la fluorescence est un moyen d'analyse très sensible et bien adapté pour suivre un produit fluorescent pur à faible concentration. Elle nous permet donc de travailler directement sur les milieux de culture initialement saturés. Nous aurions pu utiliser la CLHP, mais les concentrations en HAP sont trop faibles pour permettre une analyse directe (notre détecteur est un détecteur UV, donc beaucoup moins sensible que la fluorescence) : il aurait fallu procéder à des extractions pour suivre la teneur en HAP. Cela aurait impliqué un protocole lourd et lent, alors que la fluorescence est là une méthode directe bien adaptée.

Aux concentrations inférieures à la saturation, les intensités de fluorescence mesurées sont proportionnelles à la concentration des HAP en solution.

Nous avons choisi  $\lambda_{exc}=254$  nm comme longueur d'onde d'excitation et nous suivons l'émission de fluorescence entre 254 nm et 600 nm pour connaître le spectre d'émission de fluorescence entre ces longueurs d'onde. En effet, nous saurons ainsi si des modifications apparaissent dans les spectres, i.e. si la fluorescence mesurée est bien celle du HAP initialement en solution et non pas celle de nouveaux produits qui auront des spectres différents.

Des contrôles de pertes biotiques et abiotiques des HAP dans le milieu saturé sont réalisés en inoculant les milieux de culture saturés avec les inocula autoclavés. Pour un même HAP, ces pertes doivent être fonction du consortium utilisé (la fixation par les cellules dépend des cellules utilisées), donc un contrôle est réalisé pour chaque condition de culture.

Nous avons rassemblé les courbes obtenues pour PT avec celles de FT, et celles obtenues pour AT avec celles de PY pour des questions de lisibilité des figures.

### VII.2.1 – Spectres d'émission de fluorescence caractéristiques des HAP étudiés

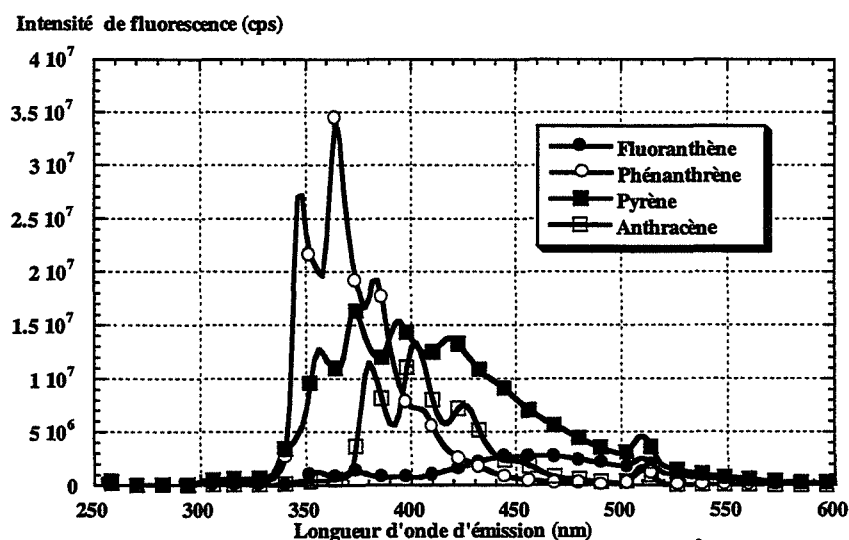


Figure VII.2.1-a : Spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc}=254$  nm) pour le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène.

La Figure VII.2.1-a donne les allures des spectres d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc}=254$  nm) pour le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène et l'anthracène.

Dans les expériences menées, les spectres sont identiques au cours de l'utilisation des HAP, seule leur intensité est modifiée.

Nous avons donc choisi d'illustrer dans la suite l'utilisation du fluoranthène, du phénanthrène, du pyrène et de l'anthracène en montrant les résultats d'émission de fluorescence aux longueurs d'onde de 456 nm, 348 nm, 372 nm et 380 nm respectivement.

### VII.2.2 – Dégradation du phénanthrène

Les Figures VII.2.2-a et VII.2.2-b illustrent l'utilisation du phénanthrène par les consortia FT, PT, PY et AT.

En ordonnée figure le rapport entre la fluorescence au temps t et la fluorescence au temps t=0 (en %) en fonction du temps en abscisse, pour chaque condition (contrôle ou non).

Comme le contrôle peut évoluer au cours du temps (pertes abiotiques et biotiques dues aux cellules mortes et non à la croissance microbienne), nous calculerons l'utilisation du phénanthrène au temps t par rapport à la teneur du contrôle au temps t, i.e. :

$$\% \text{ restant} = (\text{fluorescence de l'essai à } t) / (\text{fluorescence du contrôle à } t) \times 100$$

Ces modes de calculs seront valables dans la suite au VII.2.3, VII.2.4 et VII.2.5.

L'utilisation du phénanthrène par le consortium PT est très rapide et efficace : après une heure d'incubation, il ne reste que 2% du phénanthrène initial, et cette disparition du phénanthrène n'est pas due à une accumulation cellulaire passive puisque le contrôle est lui à 100% de la teneur initiale (Figure VII.2.2-a).

Après 45 heures d'incubation, il ne reste que 1% de phénanthrène par rapport au contrôle.

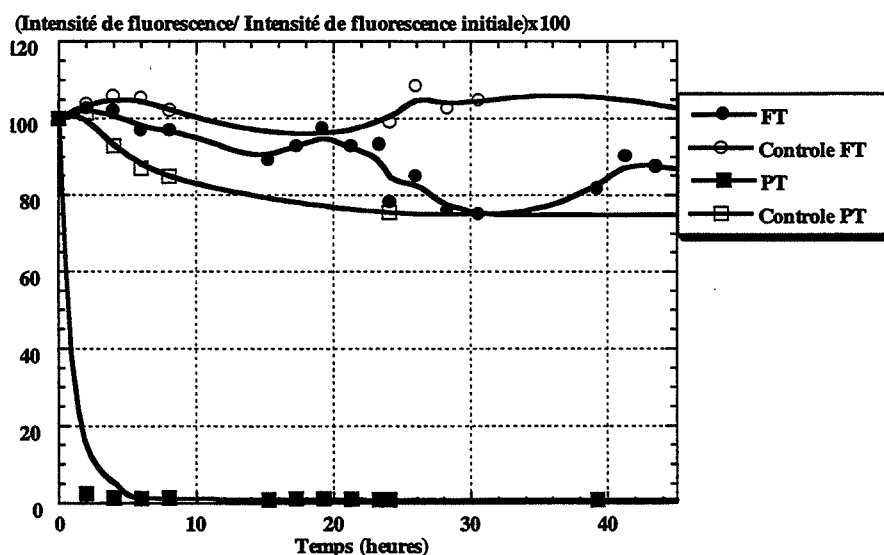


Figure VII.2.2-a : Suivi de la teneur en phénanthrène d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia FT et PT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254$  nm ;  $\lambda_{em} = 348$  nm).

Le consortium PY utilise également le phénanthrène rapidement et efficacement : la décroissance de la teneur en phénanthrène du milieu est régulière de 0 à 20 heures d'incubation, où elle atteint 1% du contrôle (Figure VII.2.2.b).

En ce qui concerne FT, l'utilisation du phénanthrène semble réelle, mais elle est moins nette : le phénanthrène atteint environ 80% du contrôle à 45 heures d'incubation. En fait, l'utilisation du phénanthrène semble apparaître plus lentement (Figure VII.2.2.a).

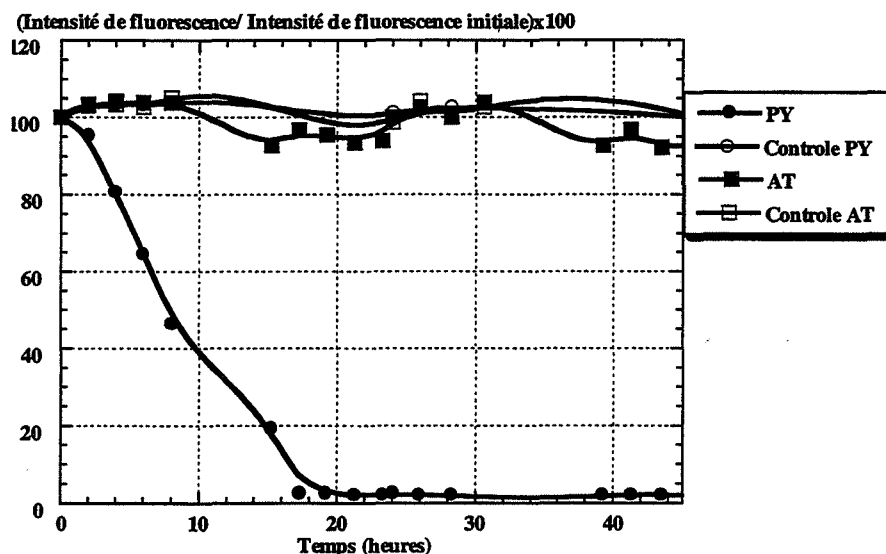


Figure VII.2.2-b : Suivi de la teneur en phénanthrène d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia PY et AT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 348 \text{ nm}$ ).

Pour AT, la teneur en phénanthrène du milieu est à 95% du contrôle à 45 heures d'incubation (Figure VII.2.2-b). Le consortium AT semble donc encore utiliser plus tardivement le phénanthrène comme substrat. En effet, nous savons qu'il est capable de l'utiliser puisque nous avons mis en évidence une croissance microbienne de AT sur le phénanthrène au VII.1.1.2, avec une phase de latence entre 3 et 7 jours.

L'échelle de temps de ces essais de suivi de dégradation en fluorescence est bien plus courte que l'échelle de temps des essais de croissance réalisés au VII.1.1. La phase de latence de la courbe de croissance de AT sur le phénanthrène est supérieure à 3 jours, donc a fortiori à 45 heures. Il se peut donc qu'une incubation de 45 heures soit trop courte pour que le processus de dégradation du phénanthrène par AT soit amorcé.

Toutefois, cela pourrait aussi signifier que AT n'utilise pas le phénanthrène en solution, mais directement sous la forme de cristaux.

### VII.2.3 – Dégradation de l'anthracène

Les contrôles sont à 100%, 65%, 75% et 100% de la teneur initiale en anthracène du milieu saturé pour respectivement les consortia FT, PT, PY et AT (Figures VII.2.3-a et VII.2.3-b).

Pour AT, PT et PY, la dégradation est immédiate, PT et PY étant très proches en absolu, mais les contrôles pour PT et PY diminuent beaucoup jusqu'à 10 heures.

Pour AT, il reste 5% de l'anthracène à 40 jours. Pour PT et PY, la teneur finale en anthracène (corrigée) est de 31% et 40% respectivement.

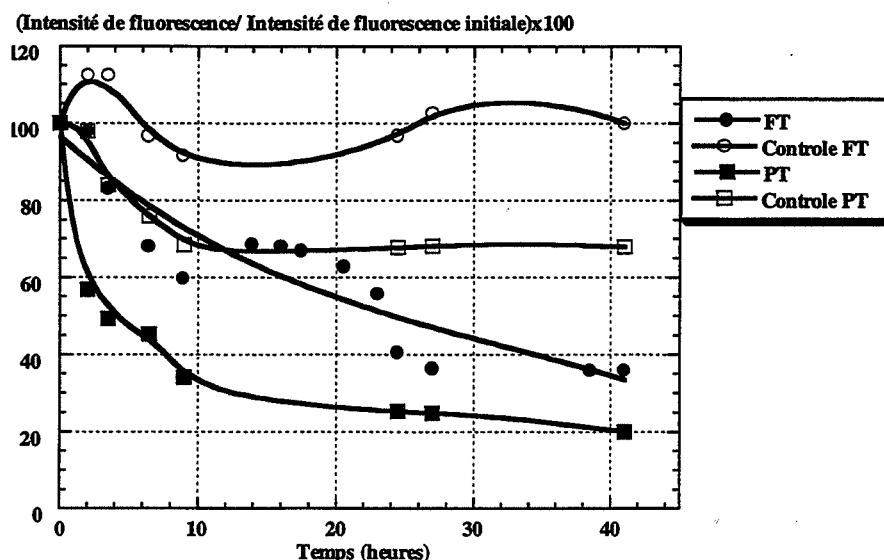


Figure VII.2.3-a : Suivi de la teneur en **anthracène** d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia FT et PT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 380 \text{ nm}$ ).

Pour FT, il reste 40% de l'anthracène initial en solution après 45 heures d'incubation.

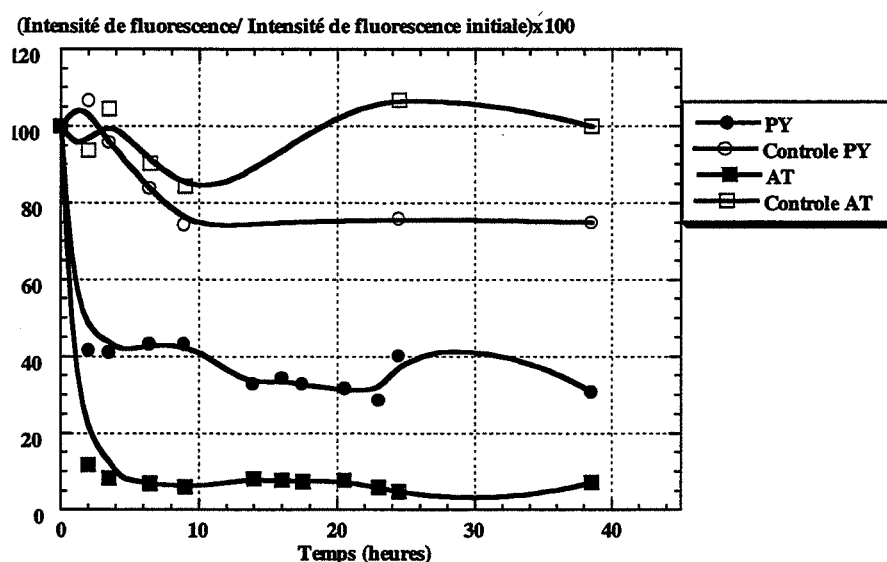


Figure VII.2.3-b : Suivi de la teneur en **anthracène** d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia PY et AT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 380 \text{ nm}$ ).

#### VII.2.4 – Dégradation du fluoranthène

Les Figures VII.2.4-a et VII.2.4-b illustrent l'utilisation du fluoranthène par les consortia FT, PT, PY et AT.

Pour FT, PT, PY et AT, le contrôle est à respectivement 90%, 85%, 90% et 100% de sa valeur initiale entre 5 heures et 45 heures d'incubation (Figures VII.2.4-a et VII.2.4-b).

Pour FT, il reste 20% du fluoranthène initial après 10 heures, la courbe de dégradation se stabilisant ensuite à 15%, soit 17% en tenant compte du contrôle, jusqu'à 45 heures (Figure VII.2.4-a).



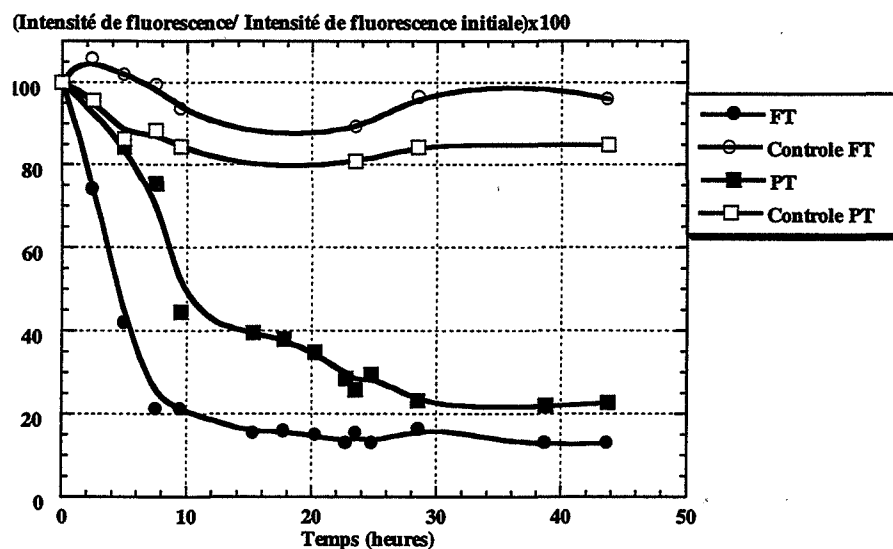


Figure VII.2.4-a : Suivi de la teneur en fluoranthène d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia FT et PT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 456 \text{ nm}$ ).

PY est le consortium qui dégrade le plus rapidement le fluoranthène en début d'expérience. Il reste 20% du fluoranthène initial en solution à 45 heures, ce qui en fait représente 22% en tenant compte du contrôle.

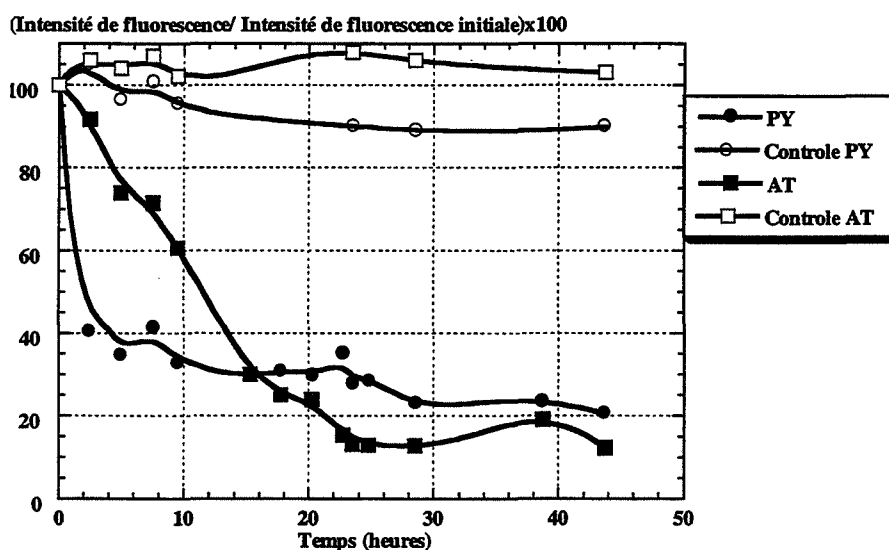


Figure VII.2.4-b : Suivi de la teneur en fluoranthène d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia PY et AT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 456 \text{ nm}$ ).

AT et PT ont le même profil jusqu'à 14 heures d'incubation, le début de la dégradation étant plus lent que pour FT. Mais PT atteint 20% de la teneur initiale en fluoranthène, i.e. 24% du contrôle à 45 heures, alors que AT rejoint FT à 22 heures et atteint 15%, i.e. 14% du contrôle.

L'utilisation du fluoranthène par les 4 consortia FT, PT, PY et AT est donc beaucoup plus rapide que ne le laissait présager la mesure de l'absorbance à 600 nm : elle commence dès l'exposition mais n'est pas mesurable en termes de biomasse par cette méthode.

Après 30 heures d'incubation, il semble qu'un palier soit atteint pour les 4 consortia : après 30 heures d'incubation, il reste de 14% à 24% (calculé par rapport à la teneur du contrôle à 30 heures), soit une moyenne de 20%, du fluoranthène mis en solution.

### VII.2.5 – Dégradation du pyrène

Les contrôles de pertes biotiques et abiotiques sur le pyrène ont des teneurs à 45 heures de 85% par rapport au pyrène initial pour FT et 95% pour PT, PY et AT (Figures VII.2.5-a et VII.2.5-b).

Ainsi, FT dégrade peu le pyrène avant 25 heures d'incubation, et à 45 heures il reste 50% du pyrène initialement en solution, soit 60% en tenant compte du contrôle.

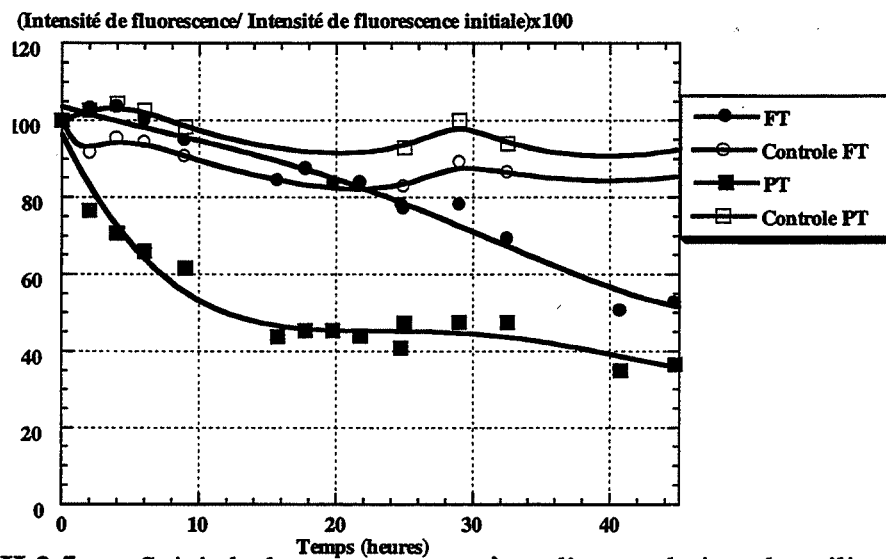


Figure VII.2.5-a : Suivi de la teneur en pyrène d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia FT et PT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 372 \text{ nm}$ ).

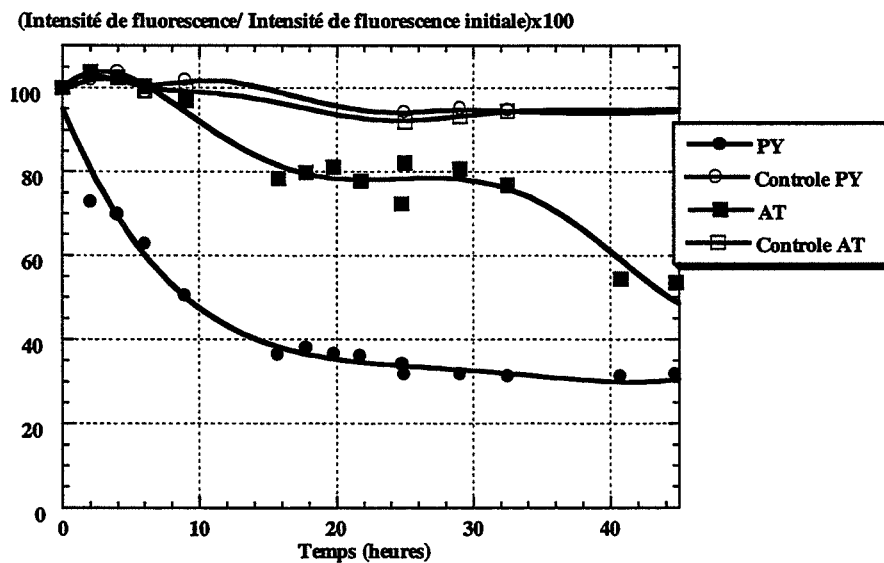


Figure VII.2.5-b : Suivi de la teneur en pyrène d'une solution de milieu minéral initialement saturée inoculée avec les consortia PY et AT par spectrométrie d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 254 \text{ nm}$  ;  $\lambda_{em} = 372 \text{ nm}$ ).

Les courbes de dégradation de PT et PY ont des allures similaires : ce sont les consortia pour lesquels la dégradation débute le plus rapidement. PT et PY atteignent respectivement 35% et 37% du pyrène initial en tenant compte des témoins.

La dégradation par AT est plus lente et atteint 47% en 45 heures.

### VII.2.6 – Bilan

La dégradation du **fluoranthène** par ces 4 consortia est de l'ordre de 80% (de 76% pour PT à 86% pour AT) en 30 heures. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau VII.2.6-a.

Sachant que la solubilité du fluoranthène en solution aqueuse est de 0,26 mg/l (cf. Tableau III.4.1-a), cela signifie que la concentration résiduelle en fluoranthène dans la solution est sans doute de 0,052 mg/l, i.e. 52 ppb.

Les 4 consortia PT, AT, FT et PY ont consommé (Tableau VII.2.6-b) en moyenne 30 µg de fluoranthène en 45 heures (et même 30 heures).

	Fluoranthène	Phénanthrène	Pyrène	Anthracène
PT	76%	99%	65%	69%
AT	86%	5%	53%	95%
FT	83%	15%	40%	60%
PY	78%	99%	63%	60%

**Tableau VII.2.6-a** : Taux de dégradation (%) du **fluoranthène**, du **phénanthrène**, du **pyrène** et de l'**anthracène** en solution saturée par les consortia FT, PT, PY et AT après 45 heures d'incubation.

La dégradation du **phénanthrène** en solution par les consortia PT et PY peut être considérée comme totale en respectivement moins d'une heure et moins de 20 heures. Sa solubilité aqueuse étant de 1,3 mg/l, la dégradation du phénanthrène est de l'ordre de 99%, la concentration résiduelle en solution est donc de 0,013 mg/l, soit 13 ppb.

Bien que nous ayons vu au VII.1.1 que la croissance des consortia FT et AT sur le phénanthrène était similaire à celle de PY (phases de latence courtes), la dégradation du phénanthrène en solution est moins rapide pour FT et AT que pour PY. Elle est même bien plus faible après 45 heures d'incubation pour AT (Tableau VII.2.6-a). Deux explications sont alors possibles.

L'échelle de temps de ces essais de suivi de dégradation en fluorescence est bien plus courte que l'échelle de temps des essais de croissance réalisés au VII.1.1. Il est donc difficile de comparer les courbes de croissance du VII.1.1 et les taux de dégradation obtenus ici. Pour AT, la phase de latence située entre 3 et 7 jours, cela peut expliquer pourquoi la dégradation du phénanthrène par AT est très faible avant 45 heures d'incubation. En outre, les quantités de phénanthrène mises en jeu sont bien plus faibles ici qu'au VII.1.1 (environ 77 fois plus faibles). Comparer les expériences est donc hasardeux.

Peut-être le consortium AT n'est pas capable d'utiliser le phénanthrène sous forme soluble et la croissance microbienne a lieu directement au contact des cristaux de phénanthrène.

Ainsi, il semble que PY s'adapte plus rapidement à l'utilisation du phénanthrène comme source carbonée que FT et que AT.

PT et PY ont consommé 193  $\mu\text{g}$  de phénanthrène en 45 heures (Tableau VII.2.6-b). FT a consommé 29,3  $\mu\text{g}$  de phénanthrène, ce qui est proche de sa consommation de fluoranthène de 32,4  $\mu\text{g}$ . Quant à AT, sa consommation de phénanthrène est de 9,8  $\mu\text{g}$ , ce qui est proche de sa consommation d'anthracène, 9,9  $\mu\text{g}$ , et de pyrène, 11,1  $\mu\text{g}$ .

	Fluoranthène	Phénanthrène	Pyrène	Anthracène
PT	29,6	193,0	13,6	7,2
AT	33,5	9,8	11,1	9,9
FT	32,4	29,3	8,4	6,3
PY	30,4	193,0	12,6	6,3

**Tableau VII.2.6-b** : Quantités de fluoranthène, phénanthrène, pyrène et anthracène consommées (en  $\mu\text{g}$ ) par les consortia FT, PT, PY et AT après 45 heures d'incubation.

Pour FT et AT, la dégradation ne semble pas terminée après 45 heures d'incubation avec le **pyrène**, la dégradation atteinte étant égale respectivement à 40% et 53% (Tableau VII.2.6-a).

Pour PT et PY, un palier est atteint vers 20 heures d'incubation pour une dégradation de respectivement 65% et 63%. La solubilité du pyrène en solution aqueuse étant égale à 0,14 mg/l, la concentration résiduelle en pyrène est donc de 0,050 mg/l, i.e. 50 ppb (comme pour le fluoranthène).

PT et PY ont consommé environ 13  $\mu\text{g}$  (Tableau VII.2.6-b) de pyrène en 45 heures.

AT en a consommé 11,1  $\mu\text{g}$ , ce qui est proche de sa consommation de phénanthrène et d'anthracène (environ 10  $\mu\text{g}$ ).

FT en a consommé 8,4  $\mu\text{g}$ , ce qui est proche de sa consommation d'anthracène.

Pour l'**anthracène**, des limites semblent atteintes pour les 4 consortia à 45 heures. La solubilité en solution aqueuse de l'anthracène étant de 0,07 mg/l, cela signifie que les concentrations résiduelles en anthracène sont respectivement de 0,028 mg/l, 0,021 mg/l, 0,028 mg/l et 0,0035 mg/l, i.e. 28 ppb, 21 ppb, 28 ppb et 3,5 ppb pour les consortia FT, PT, PY et AT.

FT et PY ont consommé 6,3  $\mu\text{g}$  d'anthracène en 45 heures, ce qui est proche de celle de PT, égale à 7,2  $\mu\text{g}$  (Tableau VII.2.6-b).

AT a consommé 9,9  $\mu\text{g}$  d'anthracène, ce qui est similaire à ses consommations de phénanthrène (9,8  $\mu\text{g}$ ) et de pyrène (11,1  $\mu\text{g}$ ).

Donc, si nous nous référons au Tableau VII.2.6-b, les 4 consortia PT, AT, FT et PY consomment environ la même quantité de fluoranthène (de 29,6 à 33,5  $\mu\text{g}$ ), d'anthracène (de 6,3 à 9,9  $\mu\text{g}$ ) et de pyrène (de 8,4 à 13,6  $\mu\text{g}$ ).

Pour le phénanthrène, les différences entre les consortia sont plus marquées. PT et PY en ont consommé 193  $\mu\text{g}$  en 45 heures (et même en 30), alors que FT 29,3  $\mu\text{g}$  et AT 9,8  $\mu\text{g}$ . Les mécanismes de dégradation du phénanthrène par ces consortia sont peut-être simplement plus lents à se mettre en œuvre chez FT et AT que chez PT et PY.

### VII.3 – Deuxième exposition aux sources carbonées

Après avoir déterminé si les différents consortia sélectionnés pouvaient pousser sur d'autres HAP que les HAP de sélection, i.e. s'ils pouvaient se révéler suffisamment aspécifiques pour être intéressants en dépollution, nous avons voulu mener une étude

comparative de ces consortia : à partir de conditions initiales identiques, quelles sont leurs différences de comportement vis-à-vis des différents HAP ?

Aussi, il est intéressant de comparer les consortia pour une même source de carbone, ce que nous avons fait en utilisant le fluoranthène, le phénanthrène, le pyrène, l'anthracène et le fluorène comme source de carbone pour les consortia où un phénomène avait lieu au VII.1.

Cette fois, nous utilisons les consortia après culture sur le HAP correspondant : pour tous les essais, il s'agit donc d'une deuxième exposition, sauf PT sur le phénanthrène, FT sur le fluoranthène, PY sur le pyrène et AT sur anthracène. Là, il s'agit de plus de la deuxième exposition (à cause du mode de sélection des consortia). Donc, logiquement (cf. I.4.1.1), la production de métabolites et/ou la biodégradation devraient être plus fortes dans ce cas.

Nous suivons l'absorbance à 600 nm ( $Abs_{600nm}$ ) du milieu de culture pour la croissance, l'absorbance à 300 nm ou 400 nm ( $Abs$ ) du surnageant de culture pour la production et l'accumulation de métabolites, et le rapport des deux. Ce rapport permet de comparer l'accumulation de produits de dégradation entre les différents consortia.  $Abs_{600nm}$  et  $Abs$  (300 nm ou 400 nm) évaluant respectivement la biomasse microbienne et la quantité de métabolites accumulés, leur rapport évalue la quantité de produits accumulés par unité de biomasse. Cette évaluation est grossière, mais significative. Elle permettra de comparer les « performances » des consortia. Seules les courbes les plus caractéristiques sont données dans la suite.

### VII.3.1 – Phénanthrène

Les croissances des consortia AT, FT, PT et PY sur le phénanthrène sont très voisines, celle de PT étant la plus forte (Figure VII.3.1-a).

Aucune phase exponentielle de croissance n'est mise en évidence en représentation semi-logarithmique.

Mais pour les 4 consortia, après une phase de latence inférieure à 5 jours, on remarque une première phase de croissance linéaire, suivie d'une phase presque stationnaire, elle-même suivie d'un nouveau début de croissance après 70 jours de culture.

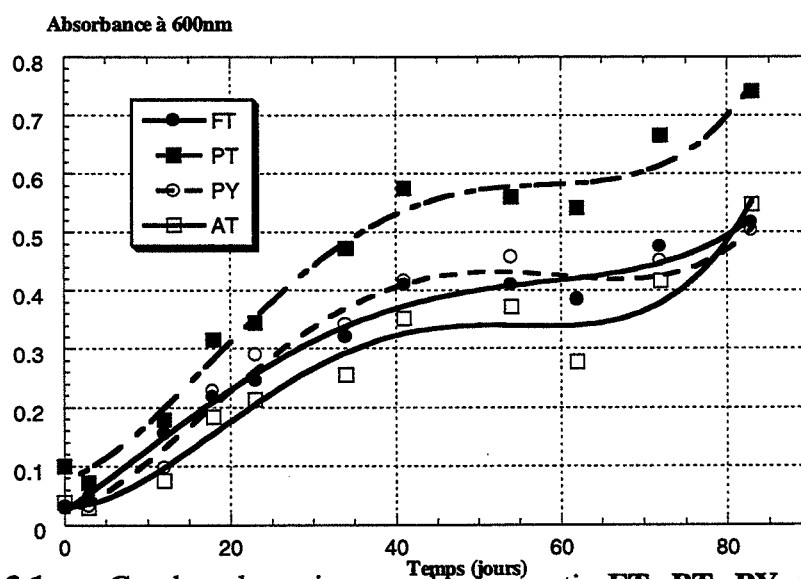


Figure VII.3.1-a : Courbes de croissance des consortia FT, PT, PY et AT sur le phénanthrène (2<sup>ème</sup> exposition).

Peut-être y-a-t-il eu production d'agents solubilisants (surfactants) au cours de cette phase stationnaire, qui a permis un redémarrage de la croissance microbienne ?

Il peut aussi s'agir de l'émergence d'une nouvelle population bactérienne, qui réprimée avant 70 jours, prend alors le dessus. Les aspects des cultures en coloration de Gram ne semblent pas modifiés, mais si cette nouvelle population est constituée de bactéries Gram-négatives, nous ne sommes pas capables d'évaluer ces modifications pour les cultures sur phénanthrène.

Les temps de latence sont toujours très courts pour tous les consortia. Pour le consortium PT, la phase de croissance jusqu'à 40 jours est linéaire. En ce qui concerne les surnageants de culture, pour les 4 consortia l'absorbance à 300 nm varie lentement de 0,1 à 0,5 entre 0 et 40 jours, puis une nette augmentation (pente plus forte) apparaît entre 40 et 70 jours : il y a accumulation de composés absorbant à 300 nm.

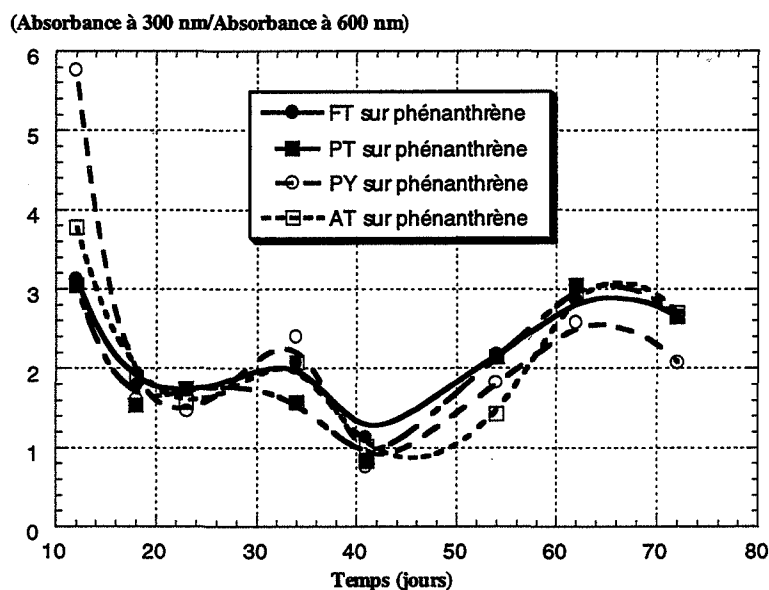


Figure VII.3.1-b : Suivi du rapport de l'absorbance à 300 nm des surnageants de culture sur l'absorbance à 600 nm des cultures des consortia FT, PT, PY et AT sur le phénanthrène (2<sup>ème</sup> exposition).

Quand nous représentons l'accumulation à 300 nm par unité de biomasse (Figure VII.3.1-b), tous les consortia sont équivalents, les profils des courbes et leurs fluctuations étant identiques. Ainsi, il n'y a pas toujours les mêmes proportions de produits de dégradation au cours de la culture dans les surnageants, mais pour différents consortia à un temps donné, les proportions relatives des composés produits lors de la consommation du phénanthrène sont les mêmes.

### VII.3.2 – Anthracène

Aucune phase de latence n'est mise en évidence sur les courbes de croissance de FT, PT, PY et AT sur l'anthracène, i.e. elles sont inférieures à 3 jours dans tous les cas (Figure VII.3.2-a).

Nous n'observons pas de phase exponentielle de croissance, ni de phase linéaire, mais la croissance est régulière, et les courbes peuvent toutes être approchées par des polynômes de degré 3 avec des bons coefficients de corrélation (0,99).

La croissance de AT sur l'anthracène est la plus faible, bien que l'anthracène soit le HAP de sélection de AT. Mais l'anthracène a la plus faible solubilité aqueuse (0,07 mg/l). La croissance de PT est supérieure à celle de PY, elle-même supérieure à celle de FT.

Si l'ordre des solubilités aqueuses était respecté, la croissance la plus forte devrait être celle de PT, puis FT, puis PY, puis AT. Or, cela n'est pas tout à fait le cas, la solubilité aqueuse n'étant pas le seul facteur déterminant. Ce problème a déjà été évoqué au VII.1.5.

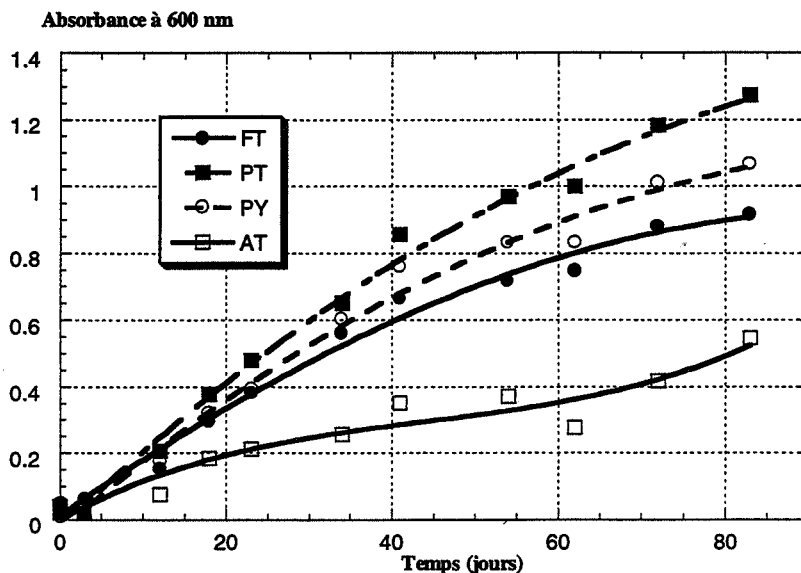


Figure VII.3.2-a : Courbes de croissance des consortia FT, PT, PY et AT sur l'anthracène (2<sup>ème</sup> exposition).

Mais, en termes d'absorbance à 300 nm des surnageants de culture, les observations sont moins nettes (courbes non indiquées ici). Les courbes sont quasiment identiques jusqu'à 40 jours, puis l'accumulation globale est plus faible pour AT que pour PT, que pour FT et PY. L'accumulation des produits absorbant à 300 nm ne suit pas le profil de croissance, en particulier l'accumulation n'est mesurable qu'après 10 jours pour FT.

Ceci est illustré dans la Figure VII.3.2-b, où l'accumulation par unité de biomasse est plus forte pour AT que pour PT, que pour PY, avec des fluctuations parallèles. D'après les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture, les produits de dégradation de l'anthracène semblent les mêmes pour FT, PT, PY et AT.

L'accumulation dans FT commence après 10 jours : la production de métabolites est mesurable plus tard que la croissance, puis devient parallèle aux autres.

AT, qui a la croissance et l'accumulation globale les plus faibles, a une « productivité » plus élevée que PY et PT. A biomasse égale, la biotransformation de l'anthracène est sans doute plus importante pour AT que pour PY et PT.

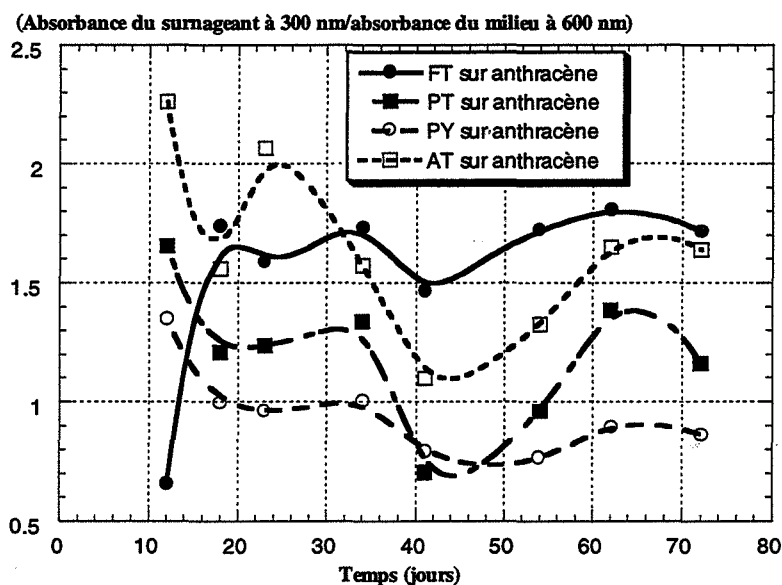


Figure VII.3.2-b : Suivi du rapport de l'absorbance à 300 nm des surnageants de culture sur l'absorbance à 600 nm des cultures des consortia FT, PT, PY et AT sur l'anthracène (2<sup>ème</sup> exposition).

### VII.3.3 – Fluoranthène

Dans les mêmes conditions initiales et de culture, les croissances des consortia FT, PT, PY et AT sur le fluoranthène sont assez différentes (Figure VII.3.3-a).

Seul FT présente une phase de croissance exponentielle.

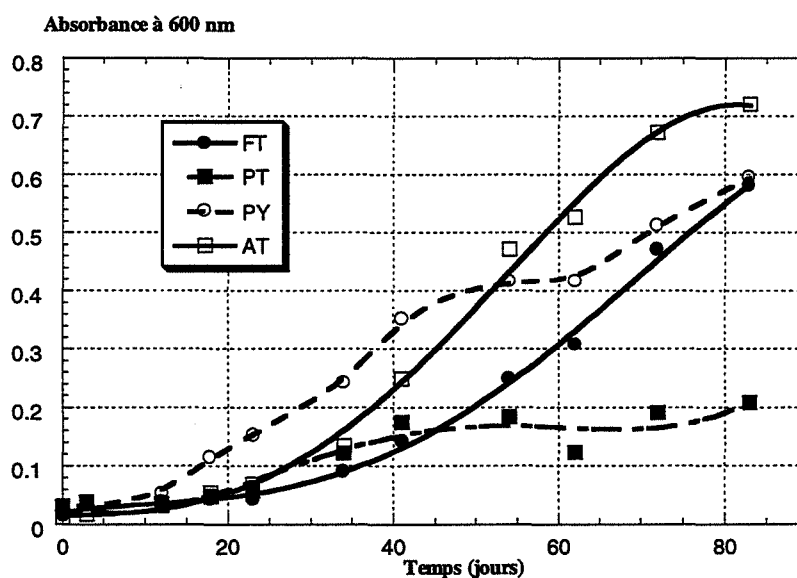


Figure VII.3.3-a : Courbes de croissance des consortia FT, PT, PY et AT sur le fluoranthène (2<sup>ème</sup> exposition).

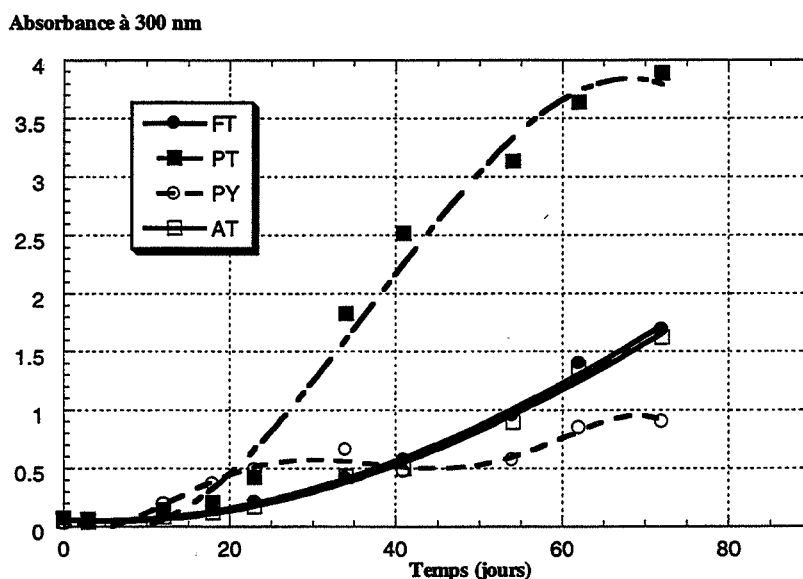
Bien que les consortia aient déjà tous été exposés (une fois pour PT, AT et PY) au fluoranthène, une phase de latence de 23 jours existe pour FT, PT et AT, contre 12 jours pour PY. Ces phases étaient de 10, 20 et 20 jours pour PT, AT et PY au VII.1.1 lors de la première



exposition au fluoranthène. Nous nous attendions à ce que FT ait la phase de latence la plus courte (cf. I.4.1.1), mais en fait seule la phase de latence de PY a diminué. En outre, la croissance de PT est plus faible à la deuxième exposition au fluoranthène.

A la Figure VII.3.3-b est représentée l'absorbance à 300 nm des surnageants des cultures réalisées sur le fluoranthène. Les profils obtenus pour les surnageants des cultures de FT, PY et AT sont similaires aux profils de croissance de la Figure VII.3.3-a, dans le sens où il existe une augmentation régulière assez parallèle, i.e. une accumulation régulière de produits absorbant à 300 nm.

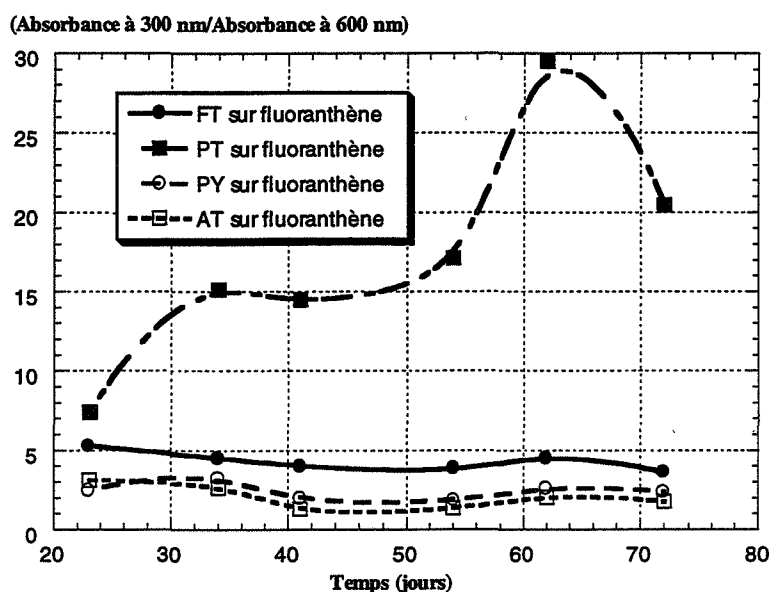
Mais le surnageant de la culture de PT sur le fluoranthène se distingue car l'absorbance mesurée est bien plus élevée (4 à 72 jours, contre 1,6 pour FT et AT et 0,9 pour PY), alors que la croissance était la plus faible de tous les consortia.



**Figure VII.3.3-b** : Suivi de l'absorbance à 300 nm des surnageants de culture des consortia FT, PT, PY et AT sur le fluoranthène (2<sup>ème</sup> exposition).

Aussi, quand la croissance a lieu (après les phases de latence), nous voyons à la Figure VII.3.3-c que le rapport représentant le taux d'accumulation de métabolites par unité de biomasse est quasiment constant pour FT, PY et AT et qu'il fluctue respectivement entre 4 et 5, 2 et 3, 1 et 3 avec des variations similaires pour ces consortia. La quantité de produits de dégradation (absorbant à 300 nm) par unité de biomasse est donc plus forte pour FT que pour PY, que pour AT, mais les proportions des différents produits dans les surnageants semblent suivre la même tendance pour ces consortia.

Pour PT, cette variable augmente jusqu'à 62 jours d'incubation. Toutefois, l'allure globale peut être la même que pour les autres consortia avec un effet d'amplification d'échelle. PT est plus « productif » que les autres consortia : pour une même biomasse, davantage de produits de dégradation semblent être accumulés dans le surnageant de culture. Il se peut aussi que les produits de la dégradation du fluoranthène par PT absorbent plus à 300 nm que les produits de dégradation du fluoranthène par AT, FT et PY.

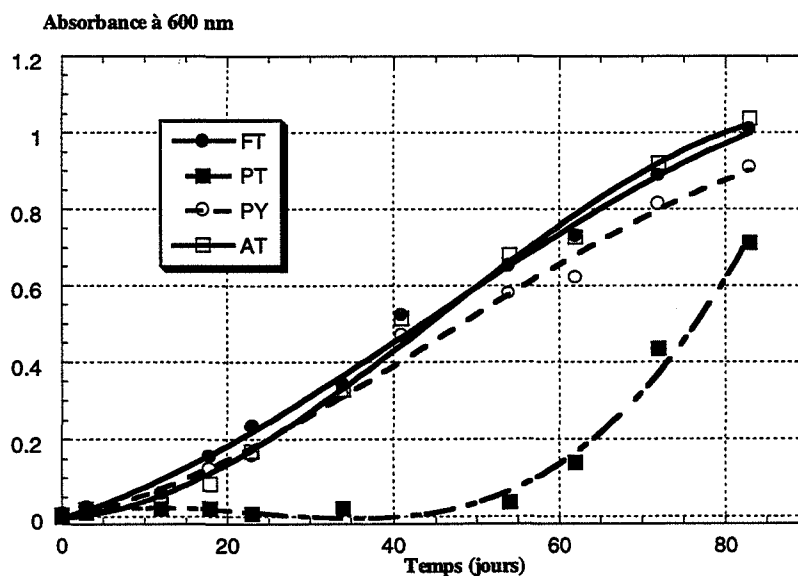


**Figure VII.3.3-c :** Suivi du rapport de l'absorbance à 300 nm des surnageants de culture sur l'absorbance à 600 nm des cultures des consortia FT, PT, PY et AT sur le fluoranthène (2<sup>ème</sup> exposition).

#### VII.3.4 – Pyrène

Les courbes de croissance de FT, PY et AT sur le pyrène sont quasiment superposables, les phases de latence étant respectivement de moins de 3 jours, 5 jours et 5 jours.

Pour le consortium PT, la phase de latence est égale à celle observée lors de la première exposition du consortium au pyrène, i.e. 40 jours (Figure VII.3.4-a).



**Figure VII.3.4-a :** Courbes de croissance des consortia FT, PT, PY et AT sur le pyrène (2<sup>ème</sup> exposition).

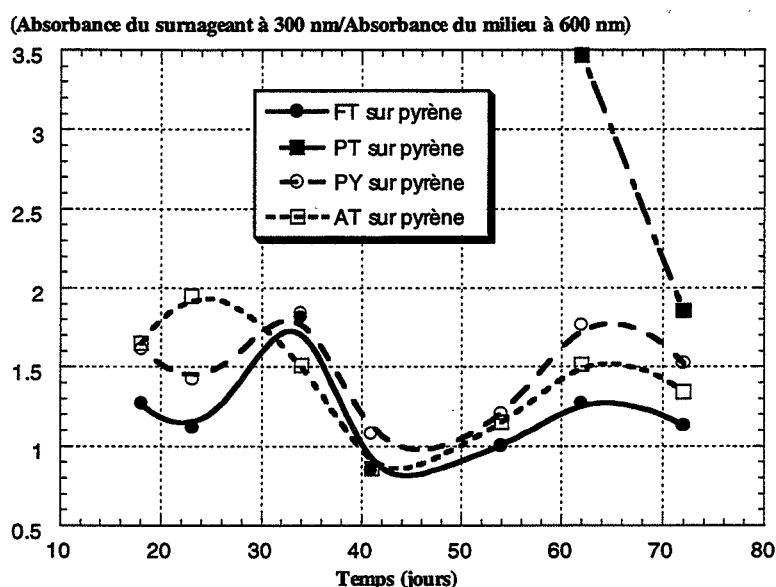
Une fois la croissance débutée, des phases linéaires de croissance sont mises en évidence pour les 4 consortia. Nous avons vu que cela correspond à une limitation de la croissance microbienne par le taux de transfert des HAP vers la phase aqueuse.

En ce qui concerne l'absorbance à 300 nm (courbes non indiquées ici) des surnageants de culture, les profils sont similaires à ceux de l'absorbance à 600 nm. La concentration des composés absorbant à 300 nm est fixée par la biomasse.

A la Figure VII.3.4-b, nous voyons que l'accumulation par unité de biomasse est similaire pour tous les consortia, sauf PT : mêmes fluctuations, amplitudes similaires.

Les proportions dans les surnageants de culture des composés produits au cours de l'utilisation du pyrène par ces consortia sont quasiment identiques entre consortia pour un temps donné.

En ce qui concerne PT, la phase de croissance mesurée est trop courte pour conclure.



**Figure VII.3.4-b :** Suivi du rapport de l'absorbance à 300 nm des surnageants de culture sur l'absorbance à 600 nm des cultures des consortia FT, PT, PY et AT sur le pyrène (2<sup>ème</sup> exposition).

### VII.3.5 – Fluorène

Aucune croissance de PT et FT sur le fluorène n'est décelable par la mesure de l'absorbance à 600 nm : il y a seulement de petites fluctuations autour de la valeur initiale.

Par contre, en suivant l'absorbance à 400 nm, la biotransformation déjà décrite aux VII.1.3 et VII.1.5 est mise en évidence (Figure VII.3.5-a). Elle débute après 20 jours d'incubation, et est plus élevée sur FT que sur PT.

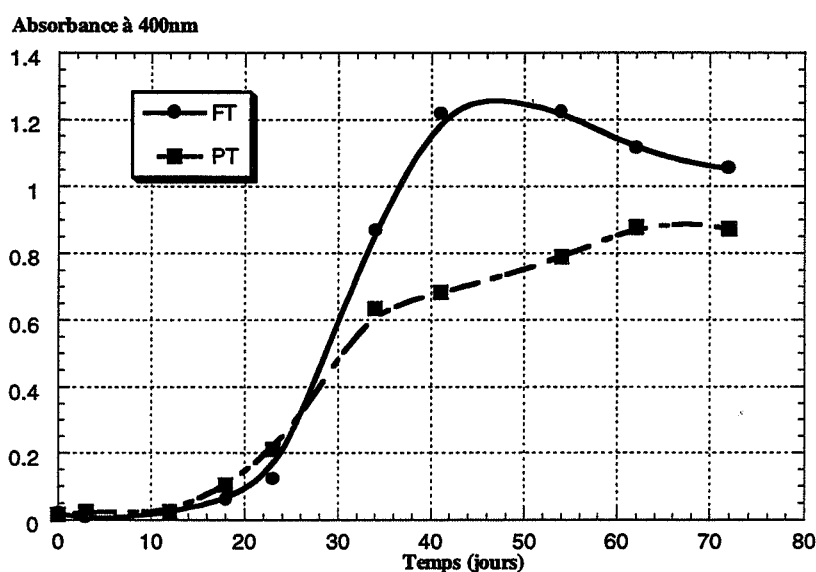


Figure VII.3.5-a : Suivi de l'absorbance à 400 nm des surnageants de culture des consortia FT et PT sur le fluorène (2<sup>ème</sup> exposition).

### VII.3.6 – Bilan

Sur le fluoranthène, la croissance des consortia FT, PT, PY et AT est toujours observée, et les phases de latence ne diminuent pas significativement, sauf pour PY. Nous observons une phase linéaire de croissance pour PY et AT, ce qui semble indiquer que la croissance de ces consortia est limitée par l'apport en fluoranthène. Cette hypothèse a été retenue par Volkering et al. (1992) qui ont observé une croissance linéaire de la concentration en biomasse de bactéries sur des HAP et l'ont reliée à la croissance linéaire des bactéries et des levures observée sur les substrats faiblement solubles (cf. III.5.2.1).

Les produits formés au cours de l'utilisation du fluoranthène par FT, PY et AT semblent identiques et en proportions similaires, alors que l'accumulation est bien plus élevée pour PT, pour lequel les proportions relatives des produits formés semblent différentes.

Sur le phénanthrène, les phases de latence pour les consortia FT, PT, PY et AT sont inférieures ou égales à 5 jours. Les courbes de croissance présentent une phase linéaire jusqu'à 40 jours, c'est-à-dire une limitation par la quantité de phénanthrène disponible, puis une phase stationnaire, et ensuite la croissance reprend : il y a peut-être production d'agents solubilisants ou émergence d'une nouvelle population bactérienne. Les réactions de dégradation du phénanthrène peuvent en effet impliquer les différentes populations constituant le consortium PT de manière séquentielle, ces populations bactériennes ayant très certainement des vitesses de croissance différentes les unes des autres. Cette seconde hypothèse est possible seulement s'il s'agit de bactéries Gram-négatives, puisque les observations en microscopie optique ne présentent pas des aspects différents entre ces phases de croissance.

Les produits de l'utilisation du phénanthrène semblent identiques et en mêmes proportions relatives pour les 4 consortia (Figure VII.3.1-b).

Sur le pyrène, les croissances de FT, AT et PY sont identiques, avec des phases de latence inférieures à 5 jours. Des phases linéaires sont mises en évidence, ce qui signifie que la

croissance est limitée par la disponibilité du pyrène (son accessibilité aux consortia n'est pas optimale).

Pour PT, la croissance est tardive puisque la phase de latence est de 40 jours : elle est identique à celle de la première exposition de PT au pyrène (Figure VII.1.1.1-a). Il semblerait que l'adaptation à l'utilisation du pyrène ait à nouveau lieu.

En ce qui concerne les produits formés au cours de l'utilisation du pyrène, ils semblent identiques et en proportions relatives égales (une fois la croissance débutée).

Sur l'antracène, la croissance des 4 consortia est immédiate, ni linéaire, ni exponentielle. Les produits formés semblent identiques, AT ayant la productivité la plus élevée.

Sur le fluorène, aucune croissance microbienne n'est observée par la mesure de l'absorbance à 600 nm, mais il existe toujours une biotransformation nette après 20 jours pour FT et PT. Les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture sont identiques pour ces 2 consortia, seule l'intensité de l'absorbance est plus forte avec FT qu'avec PT. Il semble donc ici que FT ait une capacité de biotransformation du fluorène supérieure à celle de PT.

#### VII.4 – Effet de l'addition de surfactant

Nous avons vu précédemment que les différents consortia avaient des croissances plutôt lentes sur les différents HAP étudiés, les courbes de croissance étant souvent des portions de droite. Cela révèle une limitation de la croissance due à la faible solubilité des HAP en solution aqueuse.

Un des moyens communément préconisé pour surmonter ce problème est l'addition de surfactant qui augmente artificiellement la concentration aqueuse en HAP (cf. III.5.5).

Les biosurfactants sont proposés préférentiellement aux surfactants synthétiques car ces derniers posent souvent un problème de toxicité et peuvent être eux-mêmes considérés comme des polluants, alors que les biosurfactants sont souvent biodégradables.

Utilisés à des concentrations supérieures à leur CMC (Concentration de Micelle Critique), ils peuvent piéger les contaminants dans les micelles et les rendre non disponibles pour la biodégradation. Une compétition entre le surfactant et le polluant, des interactions fortes avec les surfaces bactériennes sont possibles (Putchá and Domach, 1993 ; Deschênes et al., 1996 ; Tsomides et al., 1995). Cela a été détaillé au III.5.5.

Aussi, Aronstein and Alexander (1993), et Bury and Miller (1993) ont observé que la biodégradation peut être améliorée par l'addition de surfactant en deçà de leur CMC, ou en présence de micelles de surfactant.

Ainsi, le Tween 80 (Sigma) est un biosurfactant commercial produit par *Ps. aeruginosa* ATCC 9721. Strong-Gunderson and Palumbo (1995) ont observé que le Tween 80, à des concentrations inférieures ou égales à la CMC, augmentait la biodisponibilité du toluène et du naphthalène. Mueller et al. (1989b, 1990) l'ont utilisé à 0,02% pour augmenter la solubilité du fluoranthène en solution aqueuse et améliorer le temps de génération de la souche de *Pseudomonas cepacia* EPA505 de 21 heures (en absence de Tween 80) à 11 heures (en présence de Tween 80). Dingyi et al. (1996) ont aussi travaillé dans les mêmes conditions. Enfin, Kotterman et al. (1998) l'ont également utilisé dans leurs expériences.

Nous l'avons donc choisi car il s'agit d'un biosurfactant, produit par *Ps. aeruginosa*. Or, de nombreuses souches isolées dans les consortia sont des *Ps. aeruginosa*, on peut donc penser que l'addition de Tween 80 aux cultures permettra d'avancer des phénomènes qui auraient lieu plus tard en l'absence de Tween 80. En outre, il est facilement disponible et son coût peu élevé.

Nous avons choisi de travailler à 0,03% et 0,01% de Tween 80, 0,03% correspondant à la CMC d'après Strong-Gunderson and Palumbo (1995). Nous travaillons donc à et en-dessous de la CMC. Des contrôles de croissance, non illustrés ici, nous ont montré que les consortia n'étaient pas capables de croître sur du milieu MSM contenant 0,01% ou 0,03% de Tween 80.

Nous avons choisi de suivre FT sur le fluoranthène, PT sur le phénanthrène, PY sur le pyrène et AT sur l'anthracène car nous n'avions pas la possibilité de suivre toutes les combinaisons (place et temps). Comme nous avons vu précédemment qu'il existe de nombreuses similarités entre les consortia sur une même source carbonée, nous avons choisi de suivre chaque consortium sur son HAP de sélection.

Nous n'avons mené les expériences que jusqu'à 30 jours d'incubation car nous avons travaillé ici avec un inoculum ( $Abs_{600\text{ nm}}^{\text{initiale}}=0,1$ ) plus important que précédemment, mais aussi à cause des aspects observés auparavant. Des témoins de croissance des consortia en présence de Tween 80 à 0,03% et 0,01% ont été réalisés parallèlement et aucune croissance sur le Tween n'a été observée.

#### VII.4. 1- Croissance de PT sur le phénanthrène

Les courbes de croissance de PT sur le phénanthrène en présence de Tween 80 (0,03% et 0,01%) ou non sont linéaires : elles peuvent être approchées par des droites avec des coefficients de corrélation de 0,99 (Figure VII.4.1-a).

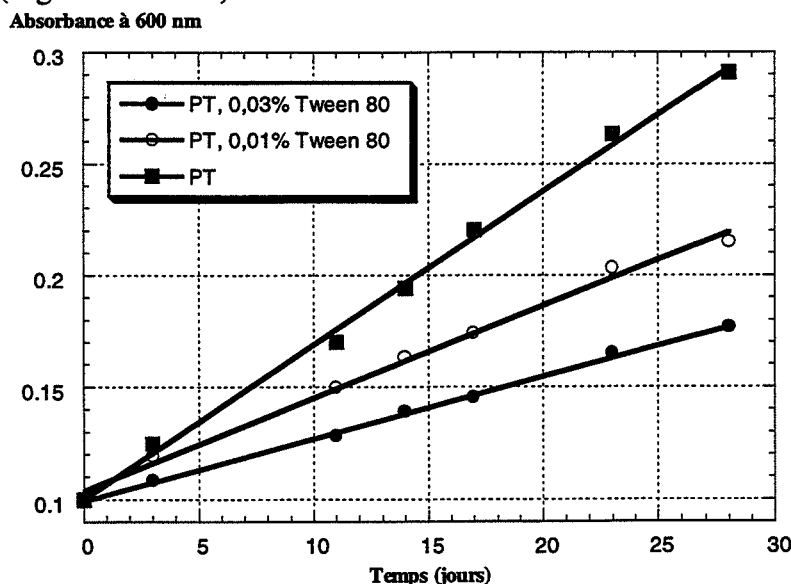


Figure VII.4.1-a : Courbes de croissance de PT sur le phénanthrène en présence de Tween 80 (0,03% ; 0,01% ; 0%).

En effet, nous avons bien observé une croissance linéaire de PT jusqu'à 30 jours de culture à la Figure VII.3.1-a. Aucune phase de latence n'est mise en évidence à nouveau.

La croissance de PT seul est meilleure qu'en présence de Tween 80 à 0,01%, elle-même meilleure qu'avec 0,03% de Tween 80 : la présence de Tween 80 inhibe donc la croissance de PT sur le phénanthrène.

Dans tous les cas, les croissances sont linéaires, elles sont donc sans doute toujours limitées par le taux de dissolution. Putchá and Domach (1993) ont supposé qu'il pouvait y avoir un phénomène de piégeage du phénanthrène par les micelles de surfactant. Les surfactants changent la répartition des charges, ce qui peut être défavorable à l'activité enzymatique ou bactérienne (action sur les membranes).

#### VII.4.2 – Croissance de AT sur l'anthracène

La courbe de croissance de AT sur l'anthracène (Figure VII.4.2-a) sans Tween 80 a la même allure qu'à la Figure VII.3.2-a jusqu'à 30 jours. Aucune phase exponentielle de croissance n'est mise en évidence en coordonnées semi-logarithmiques.

La croissance de AT sur l'anthracène en présence de Tween 80 à 0,03% et 0,01% est linéaire, il y a donc un problème de disponibilité de l'anthracène (piégeage), elle est inhibée en présence de surfactant.

Aucune phase de latence n'est mise en évidence pour les 3 conditions de culture.

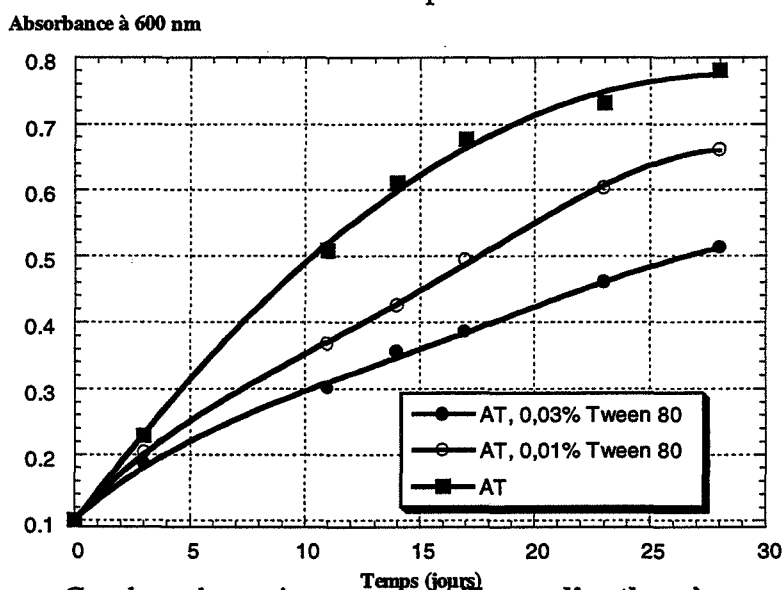


Figure VII.4.2-a : Courbes de croissance de AT sur l'anthracène en présence de Tween 80 (0,03% ; 0,01% ; 0%).

#### VII.4.3 – Croissance de FT sur le fluoranthène

Nous constatons que nous retrouvons bien l'aspect, en l'absence de Tween 80, de la courbe de croissance de la Figure VII.3.3-a, avec une phase de latence plus courte égale à 3 jours.

Aucune phase de latence n'est mise en évidence en présence de Tween 80.

En coordonnées semi-logarithmiques, FT présente une phase linéaire, sa croissance est donc exponentielle entre 5 et 20 jours. Cela n'est pas le cas en présence de Tween 80, où aucune phase linéaire ou exponentielle de croissance n'est observée (Figure VII.4.3-a).

Le Tween 80 accélère le démarrage de la croissance de FT sur le fluoranthène, mais semble la freiner, voire l'inhiber quand la concentration de biomasse augmente.

Au départ, il améliore sans doute la disponibilité du fluoranthène pour les micro-organismes, ensuite il semble qu'il empêche la croissance sur le fluoranthène, soit par un phénomène de piégeage du fluoranthène, soit par un effet toxique. Nous retiendrons plutôt cette seconde hypothèse car le piégeage du fluoranthène par le surfactant devrait impliquer une croissance linéaire de FT sur le fluoranthène en présence de Tween.

Sans surfactant, la croissance de FT augmente : le consortium produit peut-être des surfactants mieux tolérés par les micro-organismes, qui améliorent la disponibilité du fluoranthène.

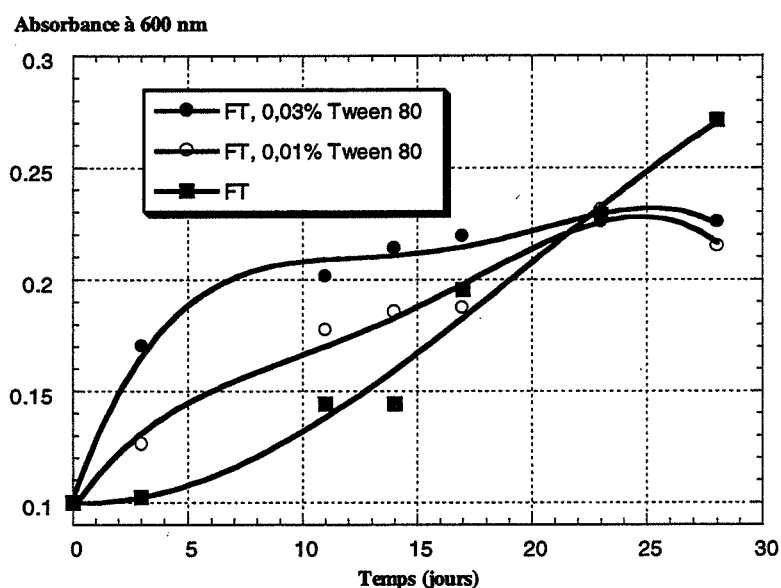


Figure VII.4.3-a : Courbes de croissance de FT sur le fluoranthène en présence de Tween 80 (0,03% ; 0,01% ; 0%).

#### VII.4.4 – Croissance de PY sur le pyrène

Aucune phase de latence n'est observée à la Figure VII.4.4-a. La courbe de croissance de PY sans Tween 80 est linéaire (cf. Figure VII.3.4-a jusqu'à 30 jours), la phase de latence étant plus courte ici : 0 jour contre 5 jours avant.

Les courbes de croissance en présence de Tween 80 présentent 2 phases linéaires entre 3 et 20 jours, puis une chute de l'absorbance à 600 nm apparaît alors que PY continue à croître.

Jusqu'à 25 jours, la croissance en présence de 0,01% Tween 80 est meilleure qu'à 0%, elle-même meilleure qu'à 0,03%. Il y a inhibition de la croissance à la CMC du Tween 80, sans doute due au piégeage du pyrène dans les micelles de surfactant, alors qu'à 0,01%, i.e. en deçà de la CMC, la disponibilité du pyrène est augmentée.



Sans doute un phénomène de toxicité du Tween 80 envers le consortium PY apparaît après 25 jours de culture.

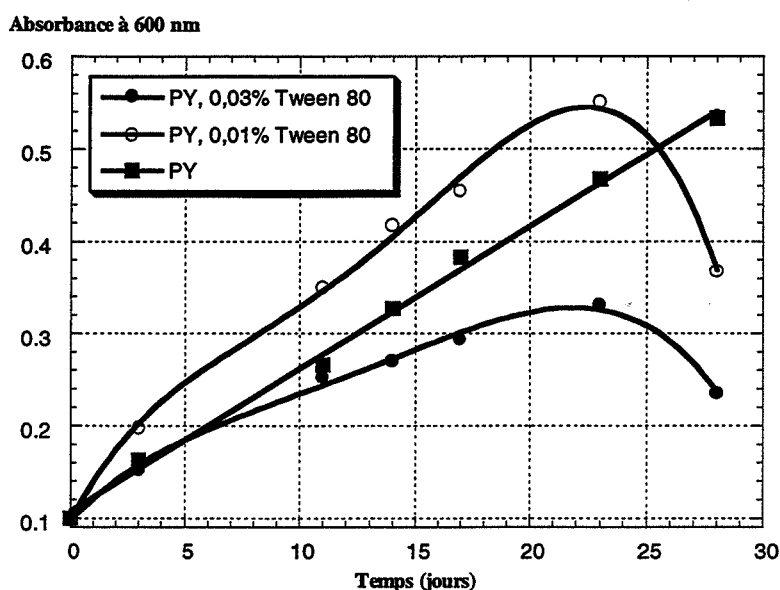


Figure VII.4.4-a : Courbes de croissance de PY sur le pyrène en présence de Tween 80 (0,03% ; 0,01% ; 0%).

#### VII.4.5 – Bilan

Pour le phénanthrène et l’anthracène, la présence de Tween 80 inhibe la croissance des consortia étudiés. Il n’y a de phase de latence ni en présence, ni en absence de Tween 80. Les courbes de croissance étant linéaires en présence de Tween 80 et la croissance meilleure à 0,01% de Tween 80 qu’à 0,03%, il peut s’agir d’un piégeage de ces HAP par le Tween. Il peut aussi s’agir d’un phénomène « toxique » du Tween 80 sur les consortia PT et AT à la concentration de 0,03%, qui n’existerait pas à 0,01% (concentration plus faible).

Pour le fluoranthène, il y a un effet accélérateur avec la concentration en Tween 80 jusqu’à 22 jours de culture, puis une inhibition. La disponibilité du fluoranthène est donc sans doute augmentée par la présence de Tween 80, puis un phénomène de toxicité pour le consortium FT apparaît.

	0,01% Tween 80	0,03% Tween 80
<b>FT</b>	Accélère la croissance jusqu’à 22 jours, puis l’inhibe (chute de l’Abs <sub>600nm</sub> ).	Accélère la croissance jusqu’à 22 jours, puis l’inhibe (chute de l’Abs <sub>600nm</sub> ).
<b>PT</b>	Ralentit la croissance	Ralentit la croissance
<b>PY</b>	Accélère la croissance jusqu’à 25 jours, puis l’inhibe (chute de l’Abs <sub>600nm</sub> ).	Ralentit la croissance puis l’inhibe (chute de l’Abs <sub>600nm</sub> ).
<b>AT</b>	Ralentit la croissance	Ralentit la croissance

Tableau VII.4.5-a : Bilan des effets du Tween 80 à 0,03% et 0,01% sur la croissance des cultures de FT sur le fluoranthène, PT sur le phénanthrène, PY sur le pyrène et AT sur l’anthracène.

De même pour le pyrène, les effets varient : à 0,03% de Tween 80, il semble qu'il y ait piégeage du pyrène et inhibition de la croissance de PY, alors qu'à 0,01% de Tween 80, il y a augmentation de la disponibilité du pyrène, ce jusqu'à 25 jours de culture.

Ensuite, l'absorbance à 600 nm des cultures en présence de Tween 80 diminue, sans doute un effet toxique apparaît.

Ainsi, les effets observés varient en fonction de la concentration en Tween 80 utilisée et en fonction du consortium étudié (Tableau VII.4.5-a). L'augmentation de la solubilité apparente n'est donc pas essentielle pour augmenter la croissance des consortia sur les différents HAP. Les problèmes pouvant se greffer à l'utilisation de surfactants revus dans notre bibliographie (cf.III.5.5) sont bien illustrés ici.

L'utilisation de surfactants pour améliorer la biodégradation des HAP est donc à étudier au cas par cas. En outre, il n'est pas certain que les phénomènes observés en solution soient représentatifs des phénomènes intervenant dans les sols.

### VII.5 – Effet de la quantité de cristaux présente

Nous savons que la quantité de cristaux de HAP présente dans le milieu de culture peut considérablement modifier la croissance microbienne. En augmentant la quantité de cristaux, la surface de contact des cristaux avec la phase aqueuse (surface de transfert) ou avec les micro-organismes est également augmentée, puisque nous sommes en culture agitée (110 tours/mn).

Si la croissance microbienne est plus rapide (aux temps faibles) quand la quantité de cristaux en suspension augmente, alors la surface de contact est effectivement essentielle pour nous. Nous avons en outre observé au microscope optique que des micro-organismes sont présents à la surface des cristaux de HAP.

De plus, cela signifie que la solubilité aqueuse n'est pas primordiale : si le polluant est peu soluble, il peut être transformé rapidement même s'il n'est pas en solution. Peut-être est-ce d'ailleurs parce que les HAP sont peu solubles en solution aqueuse que les bactéries sont obligées d'aller chercher leur substrat sur les cristaux pour se nourrir.

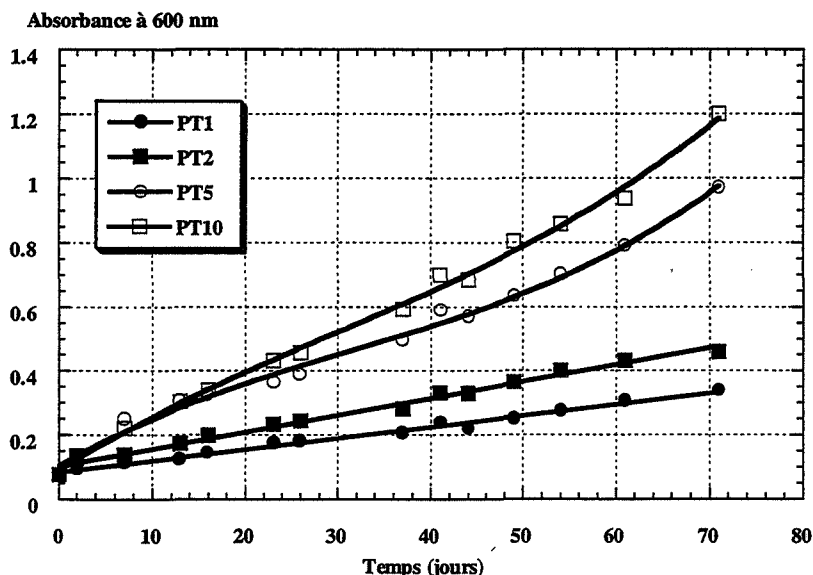
Nous désignerons par FT1 la croissance du consortium FT sur du fluoranthène à 1 mg/ml, FT2 à 2 mg/ml, FT5 à 5 mg/ml et FT10 à 10 mg/ml. Cette nomenclature est appliquée aussi à PT, PY et AT.

#### VII.5.1 – PT sur le phénanthrène

Nous observons que  $PT_{10} > PT_5 > PT_2 > PT_1$  (Figure VII.5.1-a).

Les vitesses initiales de croissance augmentent avec la quantité de cristaux présents en solution. Les courbes de croissance de PT1 et PT2 sont linéaires, il y a donc limitation de la croissance de PT par la disponibilité de phénanthrène, alors que les croissances de PT5 et PT10 sont exponentielles.

Pour ces dernières quantités de phénanthrène, il n'y a donc plus limitation de la croissance microbienne : la surface de transfert, ou de contact, est suffisamment importante pour que la croissance soit maximale dans les conditions utilisées (température, pH, agitation).



**Figure VII.5.1-a :** Courbes de croissance de PT sur le phénanthrène en présence de différentes quantités de cristaux de HAP.

PT1 = 1 mg/ml ; PT2 = 2 mg/ml ; PT5 = 5 mg/ml ; PT10 = 10 mg/ml.

C'est donc bien la faible disponibilité du substrat (phénanthrène) qui provoque la linéarité de la croissance de PT à 1 et 2 mg/ml de cristaux.

### VII.5.2 – AT sur l'anthracène

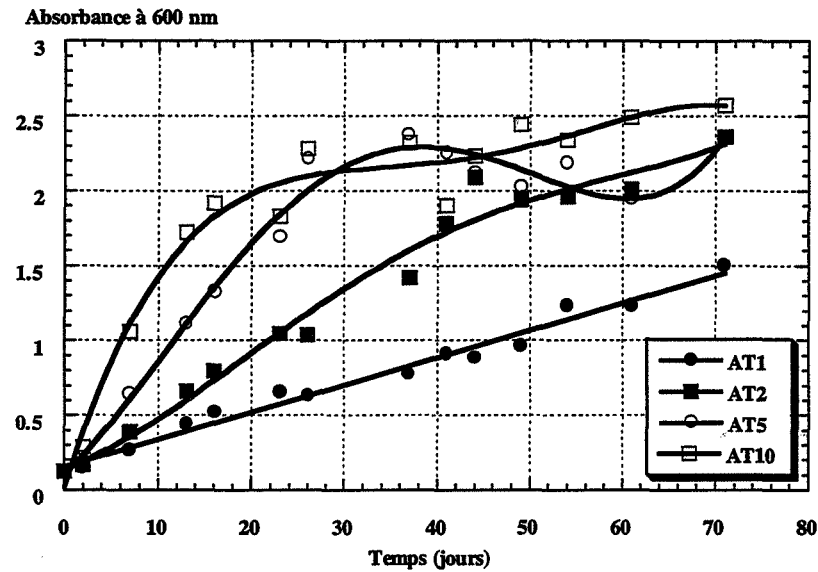
Seule la courbe de croissance de AT1 est linéaire (Figure VII.5.2-a): il y a une limitation de la croissance due à la quantité de substrat disponible.

Nous observons que  $AT_{10} > AT_5 > AT_2 > AT_1$  jusqu'à 25 jours d'incubation.

L'augmentation de la quantité de cristaux d'anthracène accélère la croissance microbienne jusqu'à 25 jours.

La vitesse initiale de croissance étant plus élevée, cela semble indiquer que c'est l'augmentation de la surface de contact des cristaux qui permet cette accélération de la croissance microbienne.

Nous n'avons pas évoqué les spectres d'absorption UV-visible des surnageants de culture car ils sont semblables à ceux déjà précédemment décrits.

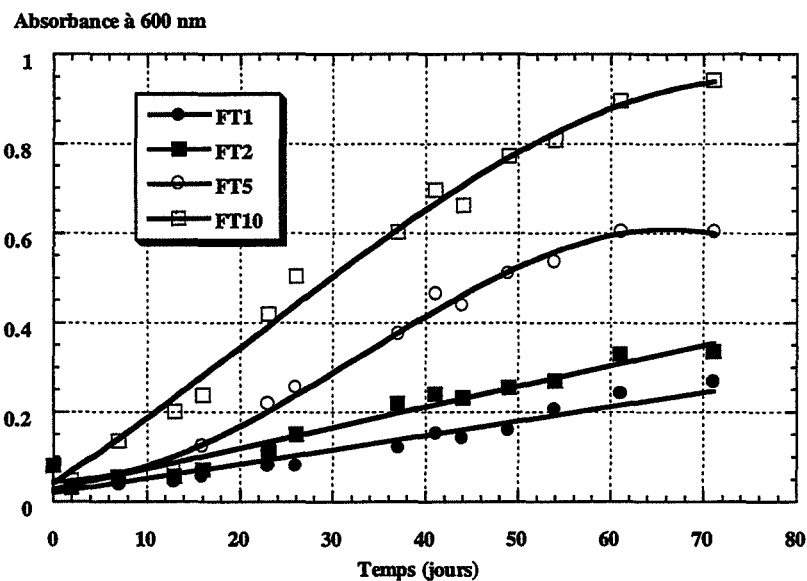


**Figure VII.5.2-a :** Courbes de croissance de AT sur l'antracène en présence de différentes quantités de cristaux de HAP.

AT1 = 1 mg/ml ; AT2 = 2 mg/ml ; AT5 = 5 mg/ml ; AT10 = 10 mg/ml.

### VII.5.3 – FT sur le fluoranthène

Nous observons que  $FT10 > FT5 > FT2 > FT1$  (Figure VII.5.3-a).



**Figure VII.5.3-a :** Courbes de croissance de FT sur le fluoranthène en présence de différentes quantités de cristaux de HAP.

FT1 = 1 mg/ml ; FT2 = 2 mg/ml ; FT5 = 5 mg/ml ; FT10 = 10 mg/ml.

Pour FT1 et FT2, la croissance est linéaire, elle est donc limitée par la disponibilité du substrat fluoranthène. La croissance n'est pas linéaire pour FT5 et FT10, mais n'est tout de même pas exponentielle (donc pas maximale).

La vitesse initiale de croissance de FT10 est supérieure à celles de FT1, FT2 et FT5. L'augmentation de la surface de contact des cristaux à 10 mg/ml améliore donc la croissance bactérienne.

La croissance est beaucoup plus élevée pour FT5 et FT10, l'absorbance à 600 nm de FT10 à 70 jours de culture étant égale à 1, contre 0,6 pour FT5, 0,35 pour FT2 et 0,25 pour FT1. Cela est sans doute dû premièrement au fait que la vitesse initiale de croissance est plus élevée pour FT5 et FT10 que pour FT1 et FT2 en raison de la plus grande surface de contact entre les cristaux et la phase aqueuse. Ensuite, cela est dû au fait que la quantité de cristaux (donc de substrat) présente dans le milieu est supérieure pour FT5 et FT10, donc la croissance microbienne sera stoppée par le manque de substrat à une valeur de Abs<sub>600nm</sub> supérieure.

Nous avons donc :

$$\begin{aligned} \text{Abs}_{600\text{ nm}} (\text{FT10 à 70 jours}) &= 1,5 \times \text{Abs}_{600\text{ nm}} (\text{FT5 à 70 jours}) \\ &= 2,8 \times \text{Abs}_{600\text{ nm}} (\text{FT2 à 70 jours}) \\ &= 4,0 \times \text{Abs}_{600\text{ nm}} (\text{FT1 à 70 jours}) \end{aligned}$$

La quantité de cristaux présents est donc essentielle.

#### VII.5.4 – PY sur le pyrène

Les courbes de croissance de PY1 et PY2 sont linéaires (Figure VII.5.4-a) avec PY2>PY1 : la croissance est toujours limitée par l'apport en substrat.

PY5 a la croissance la plus élevée puis décroît après 40 jours de culture. La quantité de substrat étant plus élevée pour PY5 que PY2 et PY1, la quantité de biomasse obtenue par la croissance microbienne sur le pyrène est en effet potentiellement plus élevée.

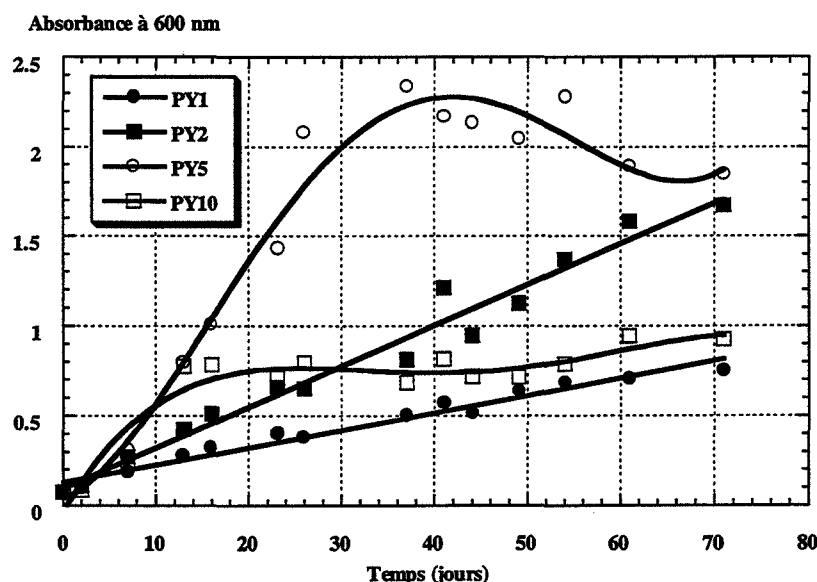


Figure VII.5.4-a : Courbes de croissance de PY sur le pyrène en présence de différentes quantités de cristaux de HAP.

PY1 = 1 mg/ml ; PY2 = 2 mg/ml ; PY5 = 5 mg/ml ; PY10 = 10 mg/ml.

La vitesse initiale de croissance de PY5 est supérieure à celle de PY2, elle-même supérieure à celle de PY1. Cela montre que l'augmentation de la surface de contact favorise la croissance microbienne.

Quant à PY10, la croissance est forte jusqu'à 10 jours, mais il n'y a plus de croissance ensuite : il y a sans doute apparition d'un phénomène de toxicité du pyrène vis-à-vis des micro-organismes à de trop fortes concentrations en pyrène.

Ainsi, l'augmentation de la surface des cristaux augmente la croissance du consortium PY, mais des phénomènes toxiques dus au pyrène apparaissent à 10 mg/ml (au moins).

#### **VII.5.5 – Bilan**

Pour FT et PT, il est clair que l'augmentation de la quantité de cristaux de HAP favorise la croissance bactérienne en termes de vitesse de croissance, mais aussi de quantité de biomasse produite. A 1 et 2 mg/ml de cristaux, la croissance est limitée par la quantité de substrat disponible, ce qui n'est plus le cas à 5 et 10 mg/ml. Le seuil au-delà duquel la croissance bactérienne ne peut augmenter davantage n'est pas atteint à 10 mg/ml de cristaux en solution, et aucun effet toxique n'est observé pour le fluoranthène et le phénanthrène à cette concentration.

Pour AT, il semble qu'un seuil soit atteint à 10 mg/ml car il y a peu de différence entre les courbes de croissance à 5 et 10 mg/ml. La croissance est linéaire, i.e. limitée par l'apport en anthracène, seulement à 1mg/ml de cristaux. L'augmentation de la quantité de cristaux d'anthracène augmente la vitesse initiale de la croissance bactérienne.

Pour PY, la croissance est linéaire à 1 et 2 mg/ml de cristaux de pyrène, mais pas pour 5 mg/ml. Les vitesses initiales de croissance augmentent avec la quantité de cristaux en solution. La croissance est plus faible à 10 mg/ml qu'à 5 mg/ml de pyrène : un effet toxique du pyrène apparaît aux fortes concentrations.

Ainsi, la quantité de cristaux de HAP et donc la surface de contact sont particulièrement importantes pour la vitesse de croissance des consortia : les HAP sont faiblement solubles dans l'eau, mais c'est en fait plus la quantité globale de HAP présente qui détermine le taux de transfert et donc l'utilisation des HAP par les consortia étudiés et la croissance microbienne.

#### **VII.6 – Mise en évidence des composés produits au cours de l'utilisation du fluoranthène, du phénanthrène, du pyrène et de l'anthracène par les consortia FT, PT, PY et AT**

Nous avons vu aux VII.1 et VII.3 qu'il y a production de composés solubles dans l'eau, absorbant dans l'UV et/ou le visible au cours de l'utilisation des différents HAP (fluoranthène, phénanthrène, pyrène, anthracène et fluorène) étudiés par les consortia FT, PT, PY et AT.

Nous avons donc cherché à identifier ces composés en procédant d'abord à leur séparation en CLHP (phase inverse) par injection directe de 200 µl de surnageant de culture, et à leur détection avec un détecteur UV à barrette de diodes par acquisition des spectres d'absorption entre 200 nm et 600 nm des composés élués au cours de la séparation. Le détail du protocole est donné dans la partie IV.

Comme il est possible de trouver de nombreux métabolites différents de ces HAP dans les surnageants de culture, nous avons analysé quelques métabolites courants de la dégradation bactérienne de ces HAP dans ce système afin d'identifier qualitativement (et ensuite quantitativement) les produits formés. Nous avons ainsi utilisé les produits suivants : catéchol, acide protocatéchique, acide 3-hydroxy-2-naphtoïque, acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, acide gentisique, phtalate hydrogéné de potassium.

Aucun de ces composés n'a correspondu aux pics chromatographiques, ni aux spectres obtenus lors de l'analyse des surnageants de culture.

Aussi, nous avons tenté une identification par couplage CLHP et spectrométrie de masse au Laboratoire Central d'Analyses du CNRS de Solaize avec l'aide de Mme Flamant, comme des auteurs l'avaient déjà décrit dans la littérature (Stringfellow and Aitken, 1995 ; Gremm and Frimmel, 1994). Malgré une bonne séparation chromatographique et une bonne détection des pics en absorption UV, ces nombreuses tentatives de détection avec le spectromètre de masse des produits séparés ont été infructueuses. Les produits formés sont donc sans doute très difficilement ionisables.

Nous nous contenterons donc dans la suite des spectres d'absorption UV-visible des produits séparés et les comparerons avec nos références bibliographiques où des spectres de métabolites de HAP sont indiqués.

Dans tous les cas, il existe un pic à 2,6 mn environ sur les profils chromatographiques : il s'agit bien d'un pic dû à la dégradation car il n'apparaît pas quand on injecte du milieu MSM filtré. Nous ne l'avons pas identifié, mais comme il est commun à tous les essais, nous l'évoquons ici plutôt qu'à chaque étude.

Par contre le pic à 1,8 mn est dû au milieu minéral (MSM), il n'est pas spécifique de l'utilisation des différents HAP et a toujours la même aire à volume d'injection égal.

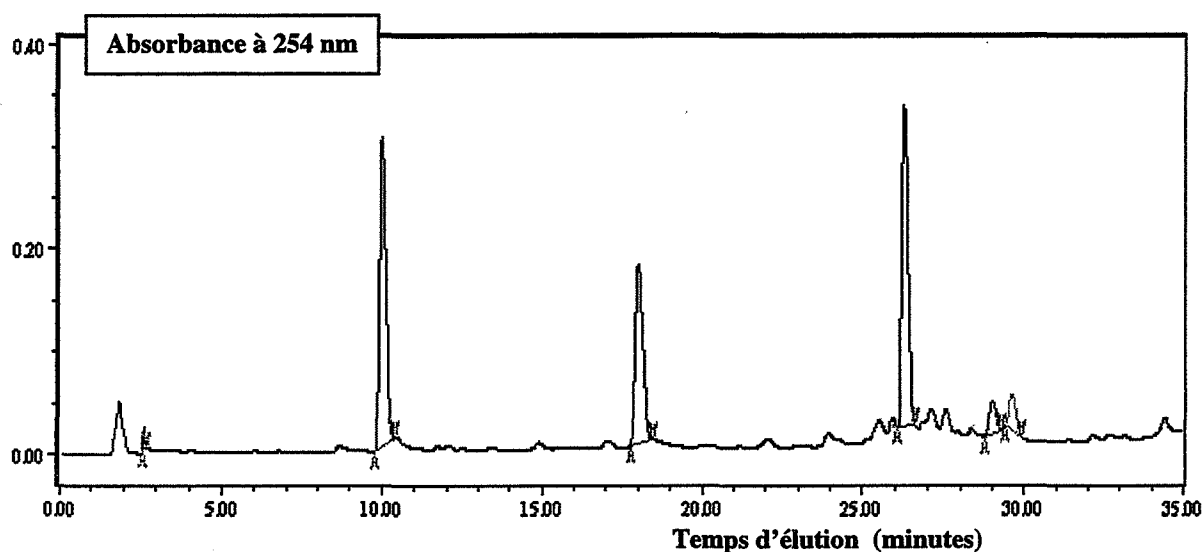
#### VII.6.1 – A partir du fluoranthène

Les profils chromatographiques des surnageants des cultures de FT, PY et AT sur le fluoranthène sont identiques, i.e. les pics séparés et leurs proportions relatives sont identiques.

Les pics majoritaires à 254 nm correspondent aux temps de rétention de 10 mn, 17,8 mn et 26 mn. Des pics moindres apparaissent également à 18,2 mn, 29 mn et 29,6 mn.

Un chromatogramme type à 254 nm de FT sur le fluoranthène est donné à la Figure VII.6.1-a.

Nous avons comparé les spectres d'absorption UV-visible des composés séparés avec ceux donnés par Mueller et al (1990) pour 2 métabolites du fluoranthène par *Ps. paucimobilis*. Le premier de ces métabolites était rouge-orange, le second brun clair. Toutefois, aucun ne correspond aux pics majoritaires de notre séparation d'après les spectres d'absorption UV-visible que nous avons acquis et ceux que ces auteurs ont décrits.



**Figure VII.6.1-a :** Chromatogramme à 254 nm du surnageant de FT sur le fluoranthène (200 µl injectés).

En ce qui concerne PT, les temps de rétention des produits séparés sont identiques aux précédents.

Temps de rétention (minutes)	$\lambda_{\text{max}}$ du produit séparé (nm)
10,0	233,9 ; 257,4 ; 319,0
17,8	224,5 ; 266,9 ; 319,0
26,2	238,6 ; 266,9 ; 314,3

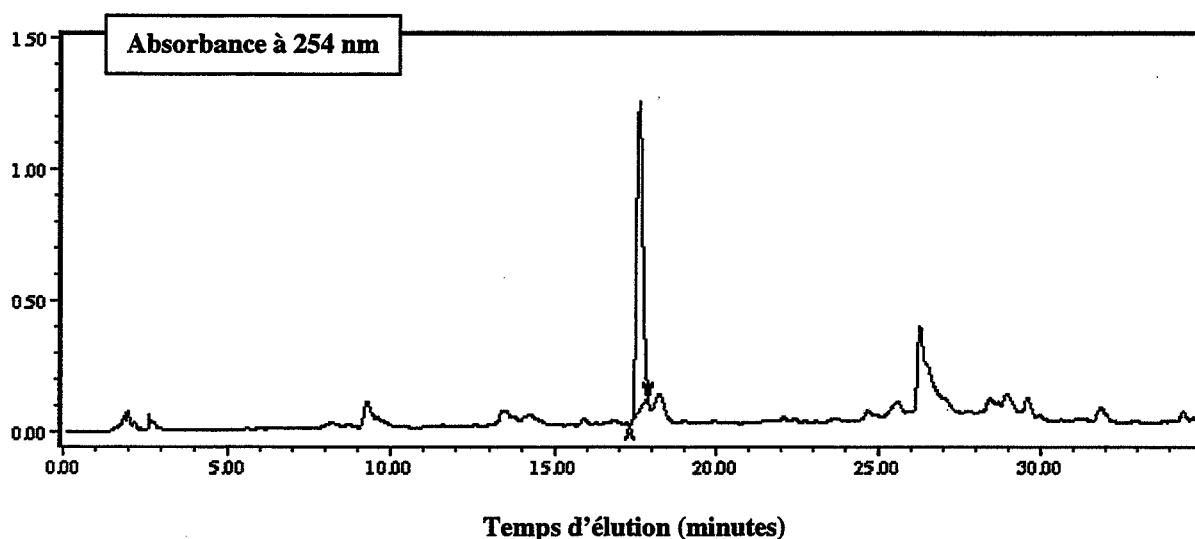
**Tableau VII.6.1-a :** Longueurs d'onde des maxima d'absorption des 3 produits majoritaires séparés au cours de l'analyse en CLHP des surnageants de culture des consortia FT et PT sur le fluoranthène.

Ayant également acquis les spectres d'absorption UV-visible entre 200 nm et 600 nm de ces produits au cours de l'analyse, nous les avons comparés avec ceux obtenus précédemment pour FT. Ainsi, aux mêmes temps de rétention, les spectres d'absorption des composés élués sont identiques, ce qui semble indiquer que ces composés sont identiques. Le Tableau VII.6.1-a nous donne les longueurs d'onde des maxima d'absorption des 3 produits élués à 10,0 mn, 17,8 mn et 26,2 mn. Les spectres d'absorption sont indiqués en ANNEXE 13.

Ces composés n'absorbent pas après 450 nm. Ils présentent des maxima locaux vers 220 nm, 260 nm et 320 nm. Nous avons en effet observé des épaulements lors de la mesure des spectres des surnageants de culture (Figure VII.1.3.3-a).

Toutefois, les proportions relatives des différents pics, et donc des produits de l'utilisation du fluoranthène, sont différents pour PT par rapport à FT. En effet, le pic à 17,8 mn est très nettement majoritaire en termes d'absorbance à 254 nm dans le surnageant de PT sur le fluoranthène (Figure VII.6.1-b).





**Figure VII.6.1-b** : Chromatogramme à 254 nm du surnageant de **PT** sur le fluoranthène (200 µl injectés).

Nous sommes conscients de l'abus de langage commis ici : quand nous évoquons les produits majoritaires, nous nous référons à l'aire des pics chromatographiques élués. En termes de concentration en solution, il n'est pas du tout certain que les produits ayant les aires les plus élevées soient aux concentrations les plus élevées.

En effet, l'aire des pics chromatographiques est fonction de la concentration des composés, mais aussi de leur pouvoir absorbant à la longueur d'onde considérée. Or, nous ne connaissons pas les pouvoirs absorbants des composés élués (et donc la relation entre absorbance et concentration) puisqu'ils ne sont pas identifiés. Nous n'avons donc pas de courbes de calibration des composés élués auxquelles nous pourrions nous référer.

C'est pourquoi nous nous intéressons à l'évolution des proportions relatives des différents pics. Elle dénote effectivement l'évolution des proportions relatives en termes de concentration.

Nous avons calculé les proportions relatives des 3 pics majoritaires à partir de leur aire à 254 nm en fonction du temps de culture pour FT et PT sur le fluoranthène (Tableau VII.6.1-b).

Temps de rétention (mn)	FT à 26 jours	FT à 37 jours	FT à 49 jours	FT à 61 jours	FT à 75 jours	PT à 75 jours
10,0	26,0	28,1	31,5	33,9	36,7	5,5
17,8	20,1	24,1	25,3	24,6	26,0	84,8
26,2	53,9	47,8	43,2	41,5	37,3	9,7
<b>Total (%)</b>	100	100	100	100	100	100

**Tableau VII.6.1-b** : Proportions relatives (%) des pics à 10,0 mn, 17,8 mn et 26,2 mn pour les surnageants de culture de **FT** et **PT** sur le fluoranthène. Le calcul est réalisé à partir des aires des pics chromatographiques à 254 nm à différents temps de culture.

Nous remarquons que la proportion du pic à 17,8 mn varie peu dans le surnageant de FT sur le fluoranthène et représente entre 20 et 25% de l'aire des 3 pics intégrés entre 26 et 75 jours

de culture. La part du pic à 10,0 mn augmente au cours du temps et passe de 26,0% à 36,7% dans le même intervalle. La part du pic à 26,2 mn diminue quant à elle de 53,9% à 37,3%.

A 75 jours, la répartition des différents composés (des pics) est très différente pour PT. Ainsi, le pic à 10,0 mn ne représente que 5,5% de l'aire totale, celui à 26,2 mn seulement 9,7%, alors que le pic à 17,8 mn est largement majoritaire puisqu'il représente 84,8% de l'aire totale.

Donc, même si les produits de la dégradation du fluoranthène sont identiques pour FT et PT, le comportement de ces 2 consortia envers le fluoranthène est différent. Les métabolites accumulés diffèrent en concentrations et quantités relatives, comme nous l'avions supposé au VII.1.3.

Toutefois, l'aire des 3 pics (données non indiquées ici) augmente au cours du temps, ce qui signifie qu'il y a accumulation dans le surnageant de culture des 3 produits élués ici à 10,0 mn, 17,8 mn et 26,2 mn.

#### VII.6.2 – A partir du phénanthrène

Moins de produits sont mis en évidence dans le chromatogramme de la séparation du surnageant de culture de PT sur le phénanthrène, par rapport à ce que nous avons vu avec le fluoranthène (Figure VII.6.2-a). Les pics qui apparaissent après 2,6 mn sont bien plus faibles que précédemment : l'absorbance maximale atteinte à 254 nm est de 0,05 AU.

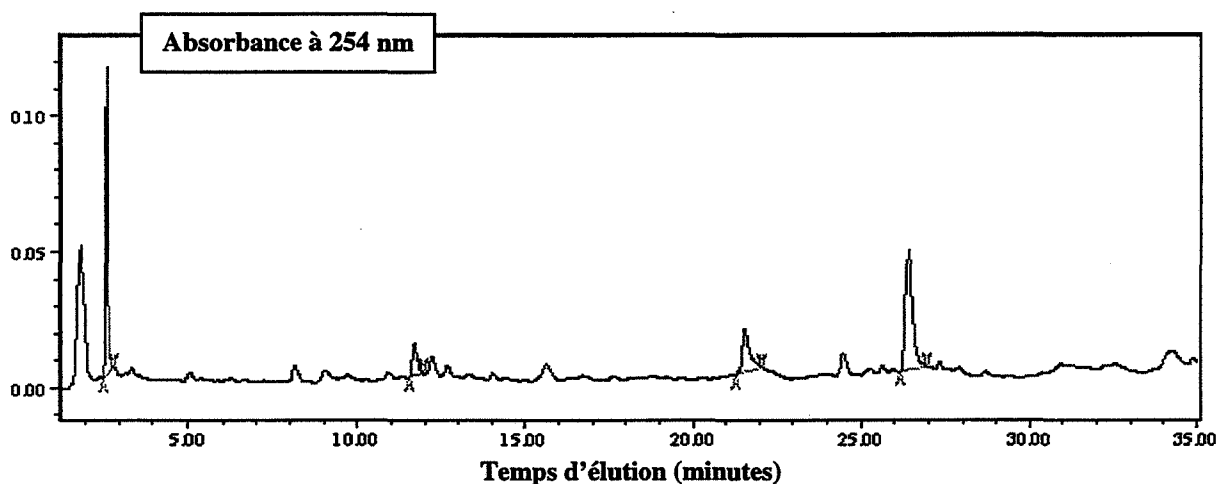


Figure VII.6.2-a : Chromatogramme à 254 nm du surnageant de culture de PT sur le phénanthrène (200 µl injectés).

Cela s'explique peut-être par le fait que le phénanthrène est plus biodégradable que le fluoranthène, et il subsiste sans doute moins de produits de dégradation dans le surnageant de culture : la dégradation du phénanthrène est sans doute plus complète que celle du fluoranthène.

Les pics majoritaires (à 254 nm) sont situés à 2,6 mn et 26,5 mn. D'autres pics plus faibles apparaissent à 11,7 mn et 21,6 mn.

Nous avons calculé au Tableau VII.6.2-a les proportions relatives de ces 4 pics à partir de leur aire à 254 nm en fonction du temps de culture pour PT sur le phénanthrène.

Le pic du composé élué à 11,7 mn semble être celui d'un produit transitoire. Il est absent à 26 jours de culture, sa proportion dans le mélange augmente jusqu'à 61 jours, puis diminue (Tableau VII.6.2-a), en même temps que sa quantité totale dans le surnageant de culture (l'aire du pic augmente jusqu'à 61 jours de culture, puis diminue).

Temps de rétention (mn)	26 jours	37 jours	41 jours	54 jours	61 jours	68 jours	75 jours
2,6	57,7	42,4	40,5	36,3	34,2	28,9	33,4
11,7	0	19,6	19,1	23,2	27,1	12,6	9,1
21,6	0	28,4	27,9	23,9	24,4	16,6	14,6
26,5	42,3	9,6	12,5	16,6	14,3	41,9	42,9
<b>Total (%)</b>	100	100	100	100	100	100	100

**Tableau VII.6.2-a :** Proportions relatives (%) des pics à 2,6 mn, 11,7 mn, 21,6 mn et 26,2 mn pour PT sur le phénanthrène. Le calcul est fait à partir des aires des pics chromatographiques à 254 nm.

Les proportions des produits élués à 2,6 mn et 26,5 mn dans le surnageant de culture varient au cours du temps (Tableau VII.6.2-a). Toutefois, le calcul des aires des pics chromatographiques correspondants (pour un volume d'injection donné de 200 µl) montre qu'il y a accumulation de ces produits de manière quantitative.

La proportion dans le mélange du pic du composé élué à 21,6 mn augmente jusqu'à 41 jours de culture, puis diminue. Toutefois, par le calcul des aires, nous avons déterminé que le composé élué à 21,6 mn est accumulé de façon régulière dans le surnageant de culture. Sa production est sans doute moins rapide que celle des 2 produits précédemment décrits, d'où une diminution de sa proportion dans le mélange.

Boldrin et al. (1993) ont mis en évidence du phénanthrène-3,4-dihydrodiol dans des surnageants de culture sur le phénanthrène. Ce composé présente des maxima d'absorbance à 250 nm, 260 nm et 310 nm, des minima à 240 nm, 255 nm et 277 nm. Un tel spectre ne correspond à aucun des produits élués ici (Tableau VII.6.2-b).

Temps de rétention (minutes)	$\lambda_{\text{max}}$ du produit séparé (nm)
11,7	210,4 ; 252,7 ; 314,3
21,6	285,8
26,5	224,5 ; 285,8

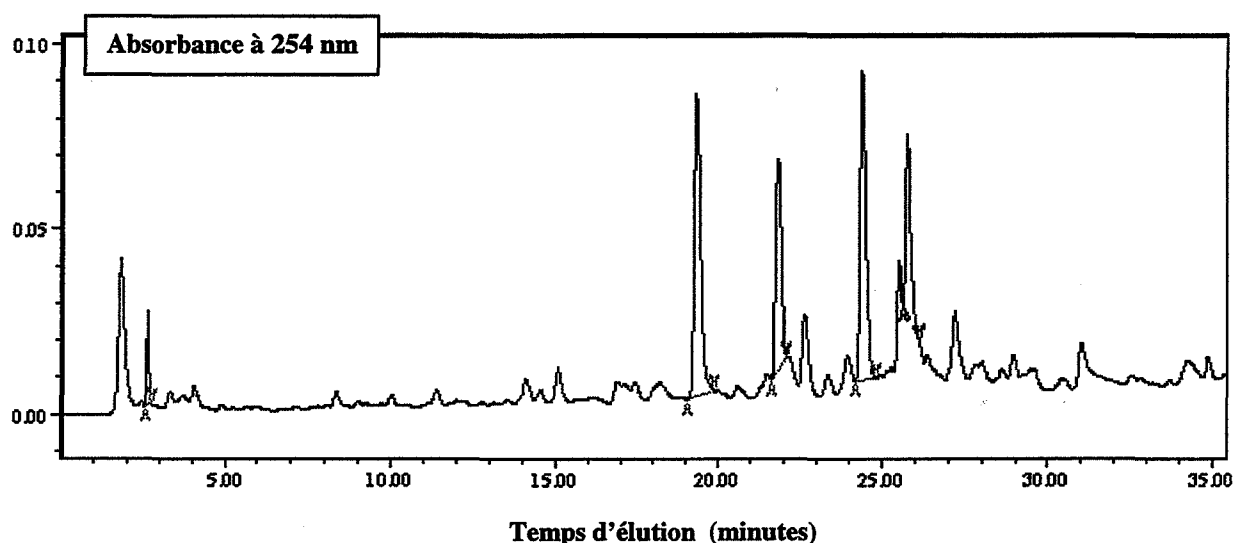
**Tableau VII.6.2-b :** Longueurs d'onde des maxima d'absorption des 3 produits majoritaires séparés au cours de l'analyse en CLHP des surnageants de culture du consortium PT sur le phénanthrène.

Les spectres d'absorption UV-visible de ces composés sont donnés dans l'ANNEXE 13.

### VII.6.3 – A partir du pyrène

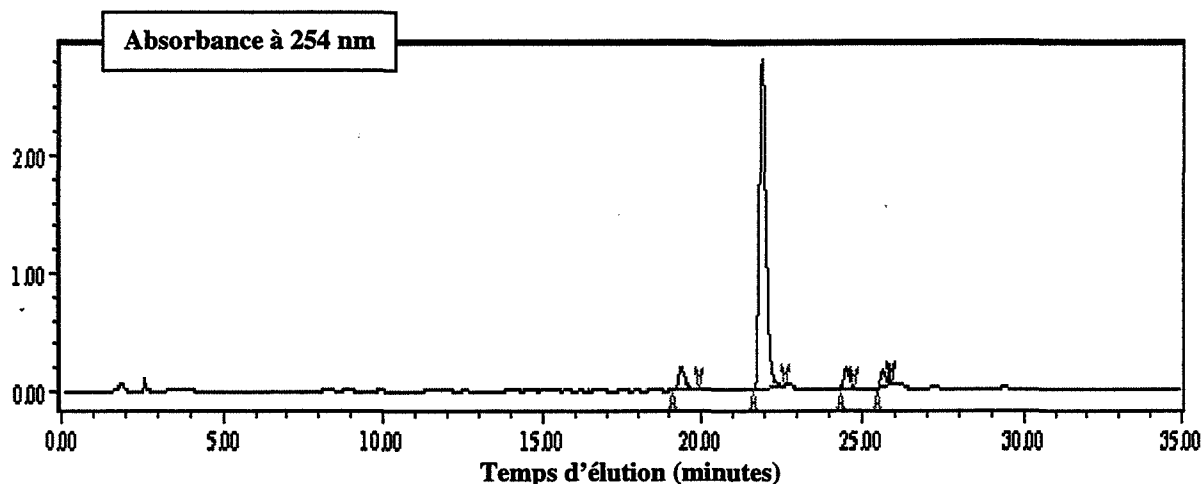
Les profils de dégradation du pyrène sont identiques pour FT, PT, PY et AT.

La Figure VII.6.3-a donne le profil chromatographique obtenu pour le surnageant de PY sur le pyrène après 30 jours de culture, et la Figure VII.6.3-b après 75 jours.



**Figure VII.6.3-a :** Chromatogramme à 254 nm du surnageant de PY sur le pyrène après 30 jours de culture (200  $\mu$ l injectés).

Après 30 jours de culture, 4 pics de surfaces comparables sont mis en évidence aux temps de rétention de 19,5 mn, 22,0 mn, 24,2 mn et 26,0 mn, ce profil étant conservé jusqu'à 42 jours de culture. Il est ensuite radicalement modifié entre 42 et 52 jours de culture pour prendre l'aspect décrit à la Figure VII.6.3-b. Le pic à 22,0 mn devient alors très majoritaire (en aire) à 254 nm.



**Figure VII.6.3-b :** Chromatogramme à 254 nm du surnageant de PY sur le pyrène après 75 jours de culture (200  $\mu$ l injectés).

Toutefois, tous les pics mis en évidence à la Figure VII.6.3-a existent toujours sur la Figure VII.6.3-b, mais ils sont bien moins intenses que le pic à 22,0 mn.

L'évolution, en fonction du temps, des proportions relatives des pics élués a été calculée au Tableau VII.6.3-a.

Temps de rétention (mn)	26 jours	37 jours	44 jours	54 jours	61 jours	68 jours	75 jours
19,5	33,0	24,1	12,9	5,8	5,1	5,5	5,6
22,0	20,4	50,5	49,9	87,7	87,9	88,6	87,0
24,2	31,5	14,1	16,9	4,5	4,5	4,4	4,2
26,0	15,1	11,3	21,3	2,0	2,5	1,5	3,2
<b>Total (%)</b>	100	100	100	100	100	100	100

**Tableau VII.6.3-a :** Proportions relatives (%) des pics à 19,5 mn, 22,0 mn, 24,2 mn et 26,0 mn pour le surnageant de PY sur le pyrène. Le calcul est réalisé à partir des aires des pics chromatographiques à 254 nm.

Ainsi, la proportion du pic à 22,0 mn dans le surnageant de culture augmente au cours du temps pour passer de 20,4% à 26 jours à 88% (en aire) environ après 54 jours de culture.

Il y a une forte production du produit élué à 22,0 mn après 54 jours, par rapport à ce qui était produit avant 54 jours. Toutefois, cela ne signifie pas qu'il soit majoritaire quantitativement, comme nous l'avons déjà évoqué au VII.6.1 pour les métabolites du fluoranthène.

Aussi, bien que la proportion (Tableau VII.6.3-a) des composés élués à 19,5 mn, 24,2 mn et 26,0 mn diminue au cours de l'incubation, à cause de la forte production de produit à 22,0 mn, tous ces composés sont accumulés dans le surnageant de culture de PY sur le pyrène. Nous l'avons mis en évidence par le calcul des aires des pics chromatographiques des produits élués à ces temps.

Les aires des pics à 19,5 mn, 24,2 mn et 26,0 mn sont doublées entre 26 jours et 75 jours de culture, alors que celle du pic à 22,0 mn est multipliée par 58 dans le même laps de temps.

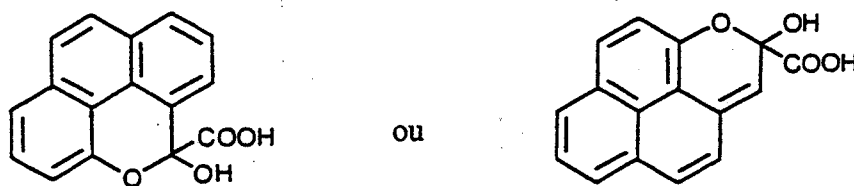
Les spectres d'absorption UV-visible des composés élués à 19,5 mn, 24,2 mn et 26,0 mn ne sont pas modifiés au cours du temps. Par contre, le spectre du composé élué à 22,0 mn (le pic majoritaire après 37 jours de culture) est modifié entre 26 et 37 jours.

Ces spectres sont indiqués en ANNEXE 13 et le Tableau VII.6.3-b donne les maxima d'absorption des pics élués.

Temps de rétention (minutes)	$\lambda_{max}$ du produit séparé (nm)
19,5	224,5 ; 276,3
22,0	219,8 ; 276,0 jusqu'à 26 jours 224,5 ; 266,9 ; 352,4 après 26 jours
24,2	229,2 ; 314,3
25,6	219,8 ; 276,3 ; 357,1

**Tableau VII.6.3-b :** Longueurs d'onde des maxima d'absorption des 4 produits majoritaires séparés au cours de l'analyse en CLHP des surnageants de culture du consortium PY sur le pyrène.

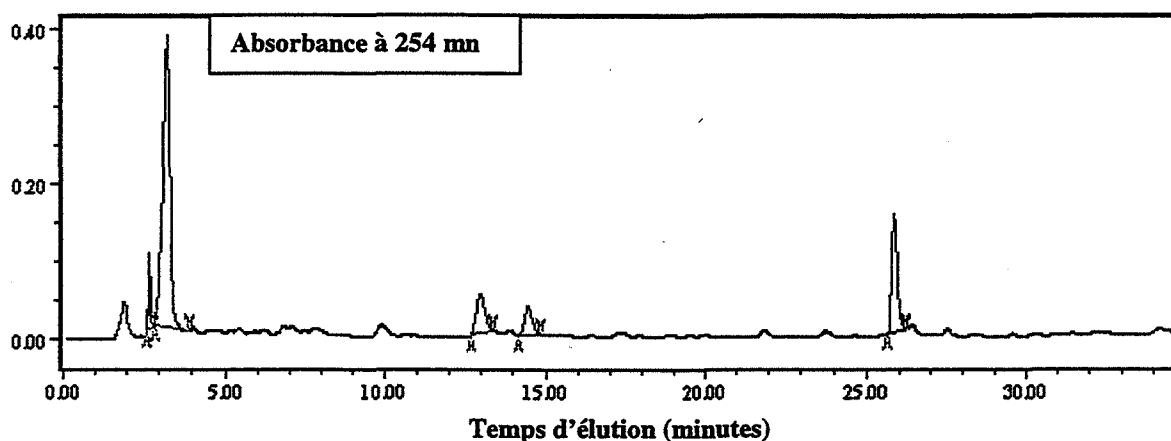
Le pic à 22,0 mn présente des maxima à 220 nm et 276 nm jusqu'à 26 jours de culture. Il peut correspondre au métabolite I du pyrène décrit par Walter et al. (1991), qui a des maxima d'absorbance à 218 nm et 276 nm. Sa formule brute est  $C_{16}H_{10}O_4$  et il s'agit d'une des deux molécules indiquées à la Figure VII.6.3-c.



**Figure VII.6.3-c** : Formules développées possibles du **métabolite I** du **pyrène** décrit par Walter et al. (1991).

#### VII.6.4 – A partir de l'anthracène

La Figure VII.6.4-a illustre la séparation des composés présents dans le surnageant de culture de AT sur l'anthracène. A 254 nm, le pic majoritaire est à 3,2 mn, les autres pics chromatographiques à 2,6 mn, 12,9 mn, 14,4 mn et 25,8 mn, étant plus faibles. Le profil est identique pour les 4 consortia.



**Figure VII.6.4-a** : Chromatogramme à 254 nm du surnageant de AT sur l'anthracène (200 µl injectés).

L'évolution, en fonction du temps, des proportions relatives des pics élués a été calculée au Tableau VII.6.4-a.

Temps de rétention (mn)	26 jours	37 jours	49 jours	61 jours	75 jours
2,6	0	0,4	0,2	3,0	4,8
3,2	47,6	56,1	64,6	58,5	58,5
12,9	16,4	13,9	11,0	11,5	10,6
14,4	3,2	4,3	4,2	5,4	6,5
25,8	32,8	25,3	20,00	21,6	19,6
<b>Total (%)</b>	100	100	100	100	100

**Tableau VII.6.4-a** : Proportions relatives (%) des pics à 2,6 mn, 3,2 mn, 12,9 mn, 14,4 mn et 25,8 mn pour le surnageant de AT sur l'anthracène. Le calcul est fait à partir des aires des pics chromatographiques à 254 nm.

La proportion du composé élué à 3,2 mn (en termes d'aires) augmente dans le surnageant de culture de 47,64% à 58,51%, alors que celles des pics à 12,9 mn et 25,8 mn diminuent. Les parts des pics à 2,6 mn et 14,4 mn atteignent au maximum 4,78% et 6,46% à 75 jours de culture.

En termes d'aires, et donc en quantité de produit présente dans le surnageant, il y a accumulation au cours du temps pour tous les produits élués présentés au Tableau VII.6.4-a.

Dans notre bibliographie, la 9,10-anthraquinone est le seul métabolite de l'anthracène décrit avec son spectre d'absorption UV-visible. Ainsi, elle a des maxima d'absorption à 251 nm, 272 nm et 327 nm, des minima à 220 nm, 268 nm et 287 nm (Field et al., 1992). Elle ne correspond donc à aucun des spectres d'absorption des pics majoritaires que nous avons mis en évidence (Tableau VII.6.4-b). Nous n'indiquons pas ici les pics minoritaires, mais les données pour la 9,10-anthraquinone ne correspondent pas non plus.

Les spectres d'absorption UV-visible des composés élués sont donnés dans l'ANNEXE 13.

Temps de rétention (minutes)	$\lambda_{max}$ du produit séparé (nm)
3,2	233,9
12,9	271,6
14,4	219,8 ; 304,8
25,8	219,8 ; 266,9

Tableau VII.6.4-b : Longueurs d'onde des maxima d'absorption des 4 produits majoritaires séparés au cours de l'analyse en CLHP des surnageants de culture du consortium AT sur l'anthracène.

### VII.6.5 – A partir du fluorène

Les Figures VII.6.5-a et VII.6.5-b sont les chromatogrammes à 254 nm des surnageants de culture de respectivement FT et PT sur le fluorène après 75 jours de culture.

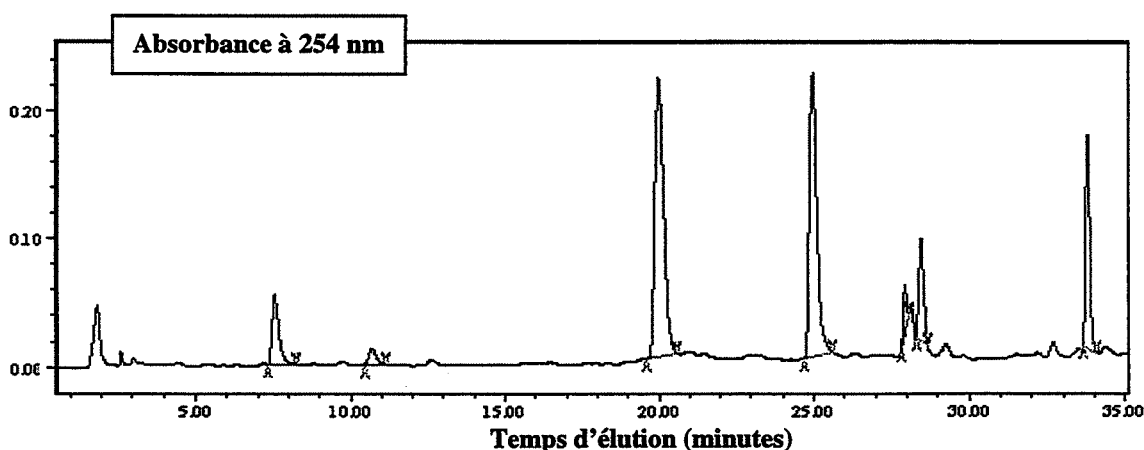


Figure VII.6.5-a : Chromatogramme à 254 nm du surnageant de FT sur le fluorène à 75 jours de culture (200 µl injectés).

Nous remarquons que les pics chromatographiques apparaissent aux mêmes temps de rétention pour les deux surnageants analysés, mais les proportions relatives des pics sont différentes entre les deux consortia (Tableau VII.6.5-a).

Nous constatons donc au Tableau VII.6.5-a que les pics à 20,0 mn et 25,0 mn sont majoritaires (en termes d'aires) dans les surnageants des 2 cultures, la proportion du produit à 20 mn atteignant 56,7% pour PT contre 36,3% pour FT. Le pic à 25,0 mn est en même proportion dans les 2 surnageants.

Des différences assez nettes apparaissent sur les pics à 8,0 mn, 28,5 mn et 33,8 mn puisque leur part atteint respectivement 6,8%, 7,7% et 13,8% pour FT, contre 0,7%, 0%, 3,7% pour PT. En additionnant les % à 20,0 mn, 28,5 mn et 33,8 mn pour FT, on atteint environ 57%, ce qui correspond au pourcentage du produit à 20,0 mn pour PT.

Temps de rétention (mn)	FT	PT
8,0	6,8	0,7
11,0	1,6	3,0
12,5	0,5	1,4
20,0	36,3	56,7
25,0	30,9	33,0
28,0	2,3	1,4
28,5	7,7	0
33,8	13,8	3,7
Total (%)	100	100

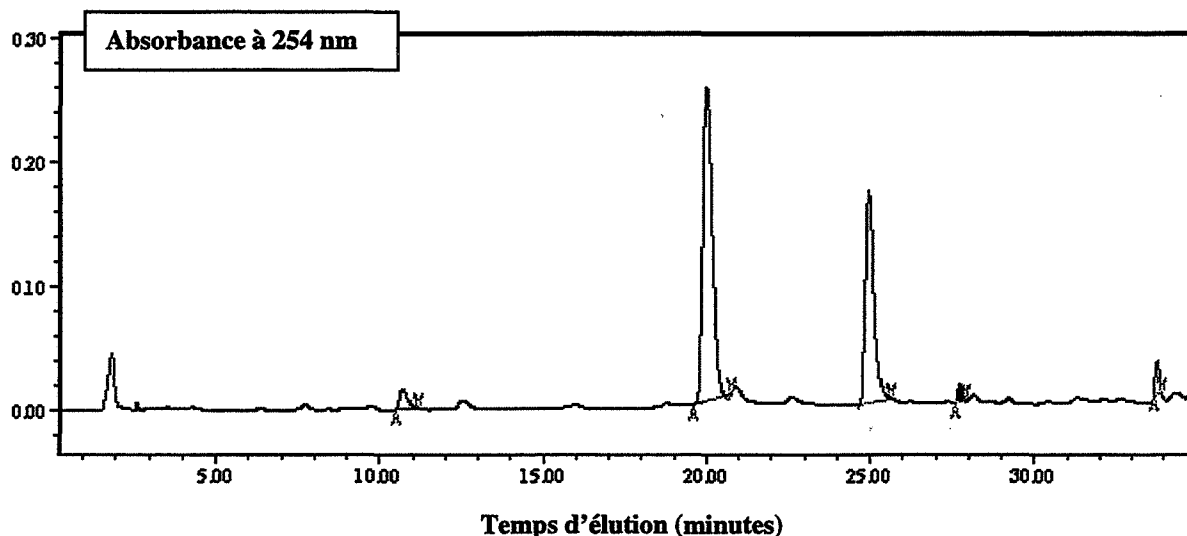
**Tableau VII.6.5-a :** Proportions relatives (%) des pics chromatographiques à 254 nm au bout de 75 jours de culture pour les surnageants de FT et PT sur le fluorène. Le calcul est fait à partir des aires des pics chromatographiques à 254 nm.

La vitesse de biotransformation du fluorène peut être différente pour les 2 consortia, et il suffirait peut-être d'attendre pour que le surnageant de FT soit dans le même état que celui de PT à 75 jours, ou l'inverse.

Les spectres d'absorption UV-visible des différents pics chromatographiques mis en évidence sont identiques entre PT et FT. Ils sont donnés dans l'ANNEXE 13. Le Tableau VII.6.5-b résume les maxima d'absorption des différents produits mis en évidence.

Le spectre UV du pic à 25,0 mn présente un maximum local à 365 nm (condition acide pH=2,0). Il s'agit sans doute du même produit (non identifié) que celui décrit par Grifoll et al. (1995) pour la dégradation du fluorène par *Ps. cepacia* F297, le surnageant de culture étant effectivement jaune brillant et le spectre de notre produit correspondant à celui décrit par eux.



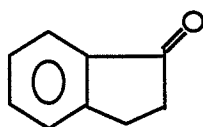


**Figure VII.6.5-b :** Chromatogramme à 254 nm du surnageant de PT sur le fluorène à 75 jours de culture (200  $\mu$ l injectés).

Ces auteurs ont également mis en évidence la 1-indanone (formule développée indiquée à la Figure VII.6.5-c) comme produit de dégradation du fluorène. Son spectre UV présente des maxima locaux à 215 nm, 246 nm et 295 nm : elle peut correspondre au produit élué à 20,0 mn.

Temps de rétention (minutes)	$\lambda_{\text{max}}$ du produit séparé (nm)
8,0	205,8 ; 248,0 ; 285,8
11,0	224,5 ; 257,4 ; 309,5
12,5	205,8 ; 248,0 ; 285,8
20,0	205,8 ; 248,0 ; 295,3
25,0	257,4 ; 309,5 (faible) ; 365,2
28,0	262,2
28,5	205,8 ; 271,6
33,8	205,8 ; 257,4 ; 295,3

**Tableau VII.6.5-b :** Longueurs d'onde des maxima d'absorption des produits majoritaires séparés au cours de l'analyse en CLHP des surnageants de culture des consortia FT et PT sur le fluorène.



**Figure VII.6.5-c :** Formule développée de la 1-indanone.

Enfin, Wischmann et al. (1996) ont mis en évidence le 9-fluorénol et la 9-fluorénone comme métabolites du fluorène. Leurs spectres d'absorption UV-visible présentent des maxima locaux à respectivement 228 nm, 235 nm, 272 nm, et 250 nm, 258 nm. Nous n'obtenons pas de spectre correspondant à la 9-fluorénone, ni au 9-fluorénol.

Ces différentes constatations sont résumées dans la Tableau VII.6.5-c.

Temps de rétention (mn)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Composé possible	Références bibliographiques
25,0	260 ; 365 (pH=2,0)	métabolite jaune	Grifoll et al. (1995)
19,9	215 ; 246 ; 295	1-indanone	

**Table VII.6.5-c : Identification possible des produits de la biotransformation du fluorène par les consortia FT et PT.**

### VII.6.6 – Bilan

Ainsi, les produits du métabolisme d'un HAP donné (phénanthrène, anthracène, fluoranthène ou pyrène) par les 4 consortia PT, AT, FT et PY semblent identiques d'après leurs temps de rétention en analyse par CLHP et leurs spectres d'absorption UV-visible.

Pour le fluorène, la remarque est identique, mais n'est valable que pour les consortia PT et FT.

Ces composés absorbent bien dans l'UV, mais nous n'avons pas été en mesure de les identifier par un couplage CLHP-spectrométrie de masse. Ils sont sans doute faiblement ionisables car nous n'avons pas réussi à obtenir de signal en spectrométrie de masse. Il ne s'agit donc certainement pas d'acides (-COOH) mais plutôt de cétones (=O), aldéhydes (-CHO), voire époxydes comme cela a été décrit dans la littérature (cf. III.5.3). Il ne s'agit en tout cas pas de catéchol, acide protocatéchique, acide 3-hydroxy-2-naphtoïque, acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, acide gentisique ou phtalate. Aucun de ces composés purs analysés en CLHP ne correspondaient aux pics apparaissant dans l'analyse des surnageants de culture.

Un composé de temps de rétention 2,6 mn est commun à la dégradation de tous les HAP étudiés.

Sur le **fluoranthène**, 3 produits « majoritaires » (selon notre définition ici) sont mis en évidence. N'ayant pas trouvé de références aux spectres d'absorption UV-visible des métabolites du fluoranthène dans notre bibliographie, nous n'avons pu mieux les identifier. Ces 3 composés s'accumulent dans les surnageants de culture.

Pour PT, la proportion dans le surnageant du composé élué à 17,8 mn est différente de celles observées dans les cultures de AT, FT, PY. Il est là très majoritaire devant les composés élués à 10,0 mn et 26,2 mn. D'ailleurs, son surnageant de culture est d'un marron bien plus intense que celui des surnageants des cultures des autres consortia sur le fluoranthène.

PT a donc un métabolisme du fluoranthène différent de AT, FT et PY.

4 composés du métabolisme du **phénanthrène** par les consortia ont été mis en évidence.

Celui de temps de rétention 11,7 mn semble être un produit transitoire, alors que les 3 autres s'accumulent dans le surnageant de culture au cours de l'incubation (2,6 mn, 26,5 mn et 21,6 mn). Nous n'avons pas identifié ces métabolites par rapport à la littérature. Nous n'avons pas trouvé de phénanthrène-3,4-dihydrodiol qui a été décrit par Boldrin et al. (1993).

5 produits de la dégradation du **pyrène** ont été séparés. 4 s'accumulent dans le surnageant de culture.

2 de ces produits correspondent au même temps de rétention de 22,0 mn. L'un apparaît jusqu'à 26 jours d'incubation (ensuite, soit il disparaît, soit il est masqué par le deuxième composé élué à 22,0 mn), l'autre à partir de 37 jours : ils sont différenciés par leurs spectres d'absorption UV-visible.

D'après la littérature et son spectre d'absorption UV-visible, le composé élué à 22,0 mn jusqu'à 26 jours peut correspondre au métabolite I ( $C_{16}H_{10}O_4$ ) décrit par Walter et al. (1991). Les autres produits ne sont pas identifiés.

Pour l'**anthracène**, 5 composés s'accumulant dans les surnageants de culture ont été mis en évidence. Aucun ne correspond à la 9,10-anthraquinone (Field et al., 1992) et n'a pu être identifié par rapport à la littérature.

Les produits de la biotransformation du **fluorène** par PT et FT sont identiques d'après leurs temps de rétention et leurs spectres d'absorption UV-visible. 5 pics majoritaires apparaissent sur les chromatogrammes des surnageants de culture.

Le composé élué à 25,0 mn peut correspondre, d'après son spectre, au métabolite jaune du fluorène (non identifié) par *Ps. cepacia* décrit par Grifoll et al. (1995). Ces auteurs ont aussi décrit la 1-indanone, dont le spectre correspond à celui du composé élué à 20,0 mn.

Enfin, les spectres du 9-fluorénol et de la 9-fluorénone décrits par Wischmann et al. (1996) ne correspondent à aucun de ceux obtenus.

Ainsi, la biodégradation du phénanthrène, de l'anthracène, du fluoranthène, du pyrène et du fluorène par les consortia sélectionnés au VI n'est pas complète : des métabolites de ces composés s'accumulent au cours du temps. Les HAP ne sont pas totalement minéralisés par ces consortia, même s'ils les utilisent pour leur croissance.

## **CHAPITRE VIII : DEGRADATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) PAR LES CONSORTIA EN MICROCOSMES DE SOL**

Nous nous intéressons maintenant à l'utilisation des consortia PT, AT, FT et PY sélectionnés et étudiés aux VI et VII pour améliorer la biodégradation des HAP dans un sol contaminé.

Nous avons en effet vu que ces consortia ne sont pas composés de micro-organismes particulièrement potentiellement dangereux, donc qu'ils peuvent être inoculés dans des sols pollués réels.

Nous avons également vu que ces consortia, sélectionnés chacun sur un unique HAP comme source carbonée, sont capables de croître sur d'autres HAP, et de les dégrader.

Tous les essais que nous avons menés dans les parties VI et VII sont des études en batch. Aussi, nous souhaitons connaître les capacités de dégradation des HAP de ces consortia dans un environnement plus proche d'un environnement naturel.

Or, nous disposons d'échantillons de sol pollué par des HAP fournis par ICF Environnement. Aussi, nous avons procédé à l'inoculation de ce sol pollué avec les consortia sélectionnés précédemment. Nous avons travaillé à 20% d'humidité du sol et pH=7,2, conditions qui nous paraissaient satisfaisantes au V.1 (sans addition de sciure, car nous n'en disposions plus).

Dans un premier temps, nous avons réalisé des essais sur des échantillons de sol pollué stérilisé par autoclavage afin de déterminer les capacités propres de dégradation des différents consortia envers les 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A..

Nous avons testé 2 quantités d'inoculum permettant des niveaux de populations du sol assez élevés pour obtenir une dégradation la plus rapide possible. Nous avons donc rapidement étudié au VIII.1.1 l'effet de ces deux quantités d'inoculum sur la biodégradation des HAP.

Nous avons réalisé des essais à 23°C et 30°C afin de déterminer si une élévation de température augmentait la biodégradation des HAP par les consortia, comme cela a été observé pour la biodégradation naturelle au V.2.

Ensuite, afin d'évaluer l'apport de l'inoculation à la biodégradation naturelle des HAP, nous avons inoculé du sol pollué non stérilisé (« naturel ») avec les consortia AT (sélectionné sur l'anthracène, un HAP tricyclique) et PY (sélectionné sur le pyrène, un HAP quadricyclique). Nous n'évaluerons pas là la capacité propre des consortia à dégrader les HAP, mais surtout leur comportement face à un milieu plus complexe. Nous évaluerons si leur utilisation dans un sol où la biodégradation préexiste améliore de manière significative le processus de biodégradation. En effet, dans le cas d'une dépollution réelle de sol, le sol à dépolluer est rarement stérile. Nous avons travaillé à 30°C, où la biodégradation était la plus rapide.

Nous n'avons étudié que AT et PY par manque d'échantillon, et aussi parce que les 4 consortia ont des comportements assez similaires.

### VIII.1 – Inoculation de microcosmes de sol stérile à 23°C et 30°C

Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer l'effet d'une différence d'inoculum de départ sur la biodégradation globale des HAP à 23°C.

Ensuite, pour une quantité d'inoculum donnée, nous avons suivi le processus de biodégradation des HAP par les 4 consortia sélectionnés à 23°C et à 30°C.

#### VIII.1.1 – Effet de la quantité d'inoculum sur la biodégradation à 23°C

Nous avons ensemencé les microcosmes de sol stérile avec des inocula des consortia PT, AT, FT et PY dont l'absorbance à 600 nm a été ajustée à 1,5. Les indices 1 et 2 correspondent à des inocula de 2 ml et 4 ml respectivement pour des quantités de sol pollué sec entre 110 et 130 g (cf. IV.5.1 et IV.5.2).

##### VIII.1.1.1 – Dénombrements sur géloses

Nous constatons sur les Figures VIII.1.1.1-a et -b que le témoin autoclavé a perdu sa stérilité entre 20 et 50 jours d'incubation. Dans l'environnement complexe que sont les microcosmes de sol, ce mode de stérilisation n'est en effet pas définitif : même en réalisant trois autoclavages séparés de 24 heures, des micro-organismes résistent. Ils prennent une forme plus résistante, comme des spores, et entrent dans une certaine inactivité, puis recolonisent le sol à leur réveil.

Différents modes de stérilisation existent : l'autoclavage, l'empoisonnement avec  $\text{HgCl}_2$ , la stérilisation par l'oxyde d'éthylène, par irradiation, ... . Seuls les deux premiers étaient envisageables dans l'environnement du laboratoire.

Nous avons donc choisi l'autoclavage comme mode de stérilisation pour inoculer du sol stérile.

L'utilisation de  $\text{HgCl}_2$  pour stériliser le témoin de sol stérile aurait permis d'avoir un témoin de pertes abiotiques, mais ce témoin n'aurait alors pas pu être un témoin pour les microcosmes inoculés. En effet, nous ne pouvions pas stériliser par  $\text{HgCl}_2$  les microcosmes à inoculer, car ce toxique aurait également empoisonné les inocula.

Or, si nous avons choisi d'empoisonner le contrôle avec  $\text{HgCl}_2$  tout en autoclavant le sol destiné aux inoculations, nous aurions omis deux phénomènes : l'influence du réveil des micro-organismes indigènes sur la biodégradation des HAP dans les microcosmes de sol autoclavé inoculés, et les modifications en termes de teneur en HAP dues à l'autoclavage. Nous avons en effet remarqué que les teneurs en HAP de 2 (essentiellement) et 3 cycles étaient plus faibles après autoclavage qu'avant. Il s'agit en effet d'un traitement thermique, qui peut donc provoquer la volatilisation des HAP les plus petits.

Nous avons donc regroupé sur deux graphes les résultats de dénombrements obtenus pour PT et AT (Figure VIII.1.1.1-a) sélectionnés sur des HAP tricycliques, respectivement le phénanthrène et l'anthracène, et pour FT et PY (Figure VIII.1.1.1-b) sélectionnés sur des HAP quadricycliques, respectivement le fluoranthène et le pyrène.

Nous remarquons que les dénombrements initiaux pour les microcosmes inoculés avec PT et FT sont tels que le dénombrement de l'inoculum 2 (4 ml) est bien environ 2 fois supérieur à celui de l'inoculum 1 (2 ml).

Par contre, pour AT et PY, cela n'est pas le cas. Nous observons même des dénombrements inférieurs avec l'inoculum 2 par rapport à l'inoculum 1 pour les microcosmes inoculés avec ces consortia. Or, nous savons pertinemment que les inocula AT2 et PY2 étaient le double de AT1 et PY1.

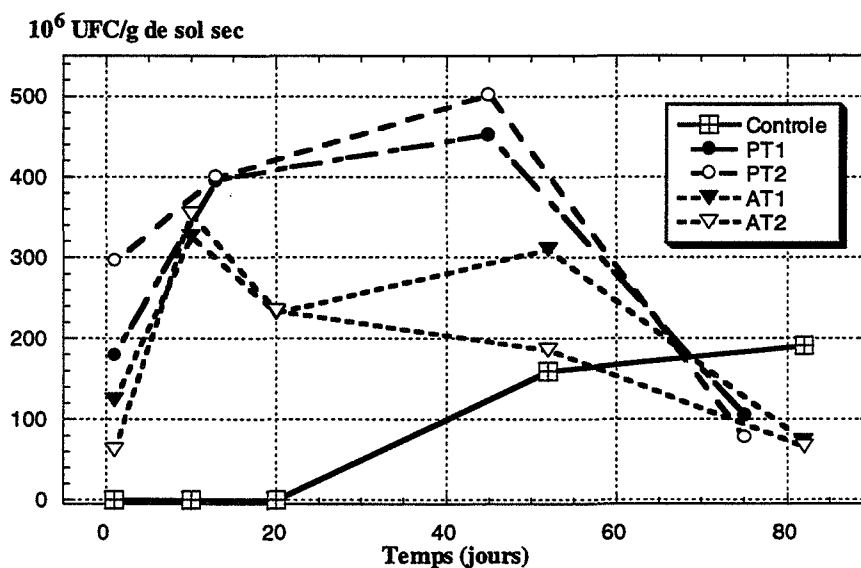
Cela peut s'expliquer par le mode de préparation des échantillons de sol pour le dénombrement. En effet, nous procédons à une extraction des micro-organismes dans le sol par dilution du sol dans une solution de NaCl 0,9%, décantation et étalement sur gélose de 100 $\mu$ l de surnageant (cf. IV.1.3). Nous avons effectué le dénombrement « initial » 1 jour après l'ensemencement afin de permettre une meilleure homogénéisation de la répartition des micro-organismes dans les microcosmes.

Aussi, selon la manière dont les micro-organismes contenus dans les inocula se comportent dans le sol, les dénombrements peuvent être modifiés même après un seul jour d'incubation (d'ailleurs, nous évoquerons à nouveau ce problème au VIII.2). Normalement, comme le sol a été autoclavé, les problèmes liés à la présence d'autres micro-organismes (prédation, ...) ne doivent pas être pris en compte ici.

Mais les bactéries constituant les consortia peuvent interagir de manière plus ou moins forte avec les particules de sol, ce qui peut limiter le dénombrement si les liaisons sont trop fortes. Alors, pour un consortium donné, les interactions doivent être identiques. Aussi, cette explication pourrait être considérée comme satisfaisante pour les consortia FT et PT, puisque les rapports entre dénombrements et quantités d'inoculum utilisées sont identiques pour ces 2 consortia.

Par contre, ce rapport n'est pas retrouvé pour les consortia AT et PY. Cette explication n'est donc pas satisfaisante.

Il est donc plus vraisemblable que les écarts observés pour AT et PY soient dus aux erreurs expérimentales (hétérogénéité de l'échantillonnage, de l'extraction) qui se retrouvent d'ailleurs à 55 jours d'incubation pour AT.



**Figure VIII.1.1.1-a :** Dénombrement sur milieu NB (pH=7,2) de la population microbienne des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT. Les indices 1 et 2 représentent les quantités d'inoculum 1 et 2 respectivement.

A la Figure VIII.1.1.1-a, les profils de PT1 et PT2 sont similaires, de même que ceux de AT1 et AT2 avec des dénombrements assez voisins.

Nous observons d'abord une phase de croissance (à 450-500.10<sup>6</sup> UFC/g) jusqu'à 50 jours d'incubation pour PT, puis une chute rapide des dénombrements entre 50 et 70 jours d'incubation.

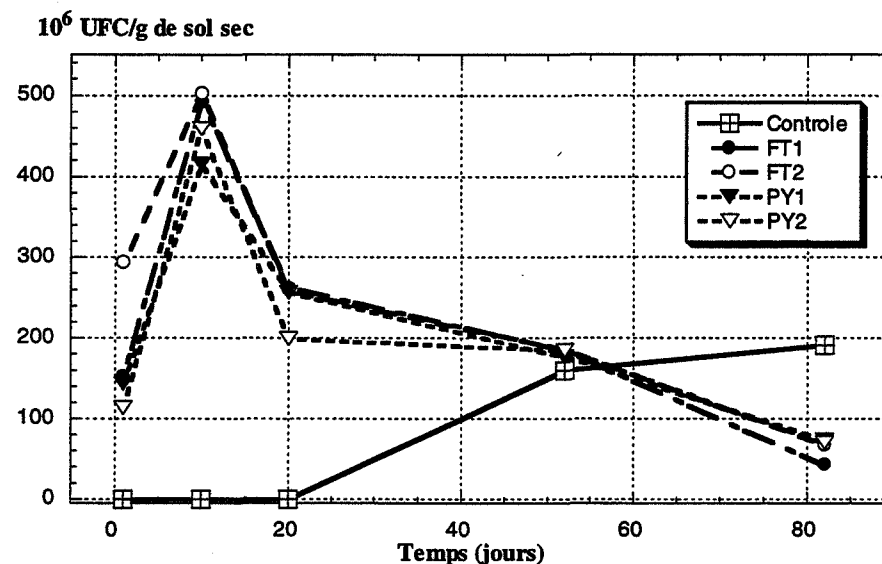
Pour AT, il y a croissance (à  $350.10^6$  UFC/g) jusqu'à 10 jours d'incubation, et la chute s'amorce entre 10 et 20 jours.

En fin d'incubation, les dénombrements sont similaires pour PT et AT, quelle que soit la densité d'inoculum de départ.

Les profils de la Figure VIII.1.1.1-b sont différents de ceux de PT1 et PT2 et ressemblent à ceux de AT1 et AT2 (Figure VIII.1.1.1-a).

Il y a augmentation entre 0 et 10 jours où les dénombrements de FT1 et de FT2 atteignent  $500.10^6$  UFC/g et ceux de PY1 et de PY2 atteignent respectivement 420 et  $460.10^6$  UFC/g. Les dénombrements chutent alors rapidement jusqu'à 20 jours d'incubation, plus lentement après. Ils atteignent entre 40 et  $80.10^6$  UFC/g à 80 jours. Pour les deux consortia FT et PY, les allures des courbes de la Figure VIII.1.1.1-b sont très similaires aux deux densités d'inoculum étudiées.

Nous remarquons que les maxima des dénombrements sont presque égaux, pour un consortium donné, aux deux densités d'inoculum étudiées.



**Figure VIII.1.1.1-b :** Dénombrement sur milieu NB (pH=7,2) de la population microbienne des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY. Les indices 1 et 2 représentent les quantités d'inoculum 1 et 2 respectivement.

Comme nous l'avons remarqué précédemment, le dénombrement n'est plus nul dans le témoin à 50 jours, alors qu'il l'était encore après 20 jours d'incubation.

Donc, dans la suite, nous pouvons effectivement considérer que la dégradation des HAP qui sera observée dans les microcosmes inoculés par rapport au témoin, jusqu'à 20 jours, est bien caractéristique des consortia inoculés dans le sol pollué.

Par contre, il faudra prendre garde aux interprétations après 20 jours d'incubation : si la dégradation d'un HAP est meilleure que dans le témoin, alors cela signifie bien que les consortia sont capables de dégrader ce HAP.

Mais, si le témoin « rattrape » les microcosmes inoculés après 20 jours, cela peut signifier, soit que les consortia ne sont pas capables de dégrader le HAP ciblé (si aucun écart au témoin n'a été observé avant 20 jours), soit que le taux maximum de dégradation de ce HAP a été atteint (si un écart au témoin a été observé avant 20 jours).

### VIII.1.1.2 – Biodégradation globale des HAP

Pour illustrer l'influence de la densité de l'inoculum utilisé sur la biodégradation des HAP, nous avons représenté l'évolution des teneurs en HAP non cancérigènes (Figures VIII.1.1.2-a et -b) et en HAP cancérigènes (Figure VIII.1.1.2-c) en fonction du temps pour les différents microcosmes étudiés.

En ce qui concerne les HAP non cancérigènes (Figures VIII.1.1.2-a et -b), il existe une dégradation plus élevée dans les microcosmes inoculés avec les différents consortia par rapport au témoin non inoculé, surtout jusqu'à 50 jours d'incubation. A 80 jours, nous voyons que la différence avec le témoin est fortement estompée, à cause du réveil de la microflore du témoin, comme nous l'avons évoqué au VIII.1.1.1.

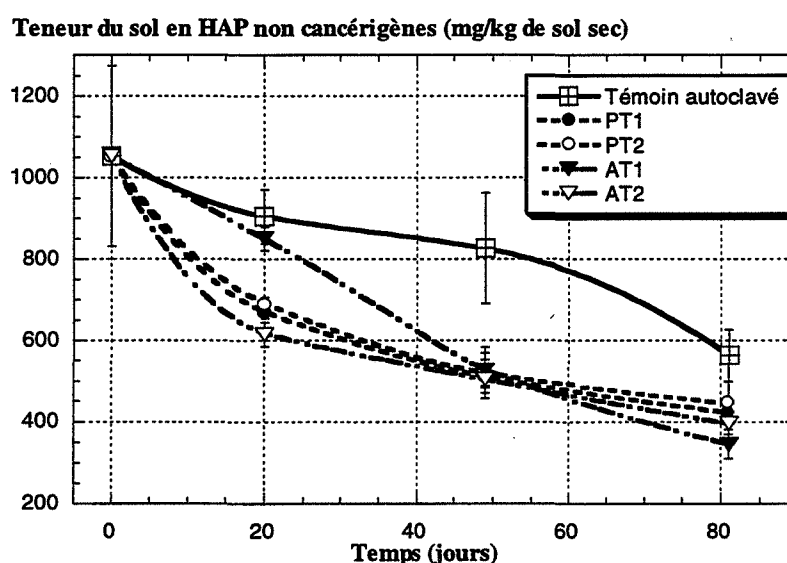


Figure VIII.1.1.2-a : Teneur en HAP non cancérigènes des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT. Les indices 1 et 2 représentent les quantités d'inoculum 1 et 2 respectivement.

Nous constatons à la Figure VIII.1.1.2-a que les courbes représentant la biodégradation par PT1 et PT2 sont quasiment identiques, qu'à 20 jours la biodégradation par AT2 est meilleure que celle par AT1, les teneurs étant similaires ensuite.

De même, la biodégradation par PY2 est meilleure à 20 jours par rapport à PY1, celles de FT1 et FT2 étant très voisines (en tenant compte des écarts-types). Après 40 jours d'incubation, nous pouvons considérer les courbes comme quasiment confondues.

Ainsi, il existe une biodégradation des HAP non cancérigènes par les consortia PT, AT, FT et PY dans les microcosmes de sol pollué inoculés.

L'inoculation avec 4 ml d'inoculum d'absorbance à 600 nm égale à 1,5 est légèrement plus performante pour la biodégradation que l'inoculation avec 2 ml : après 20 jours d'incubation, la teneur en HAP non cancérigènes des microcosmes inoculés avec PT2, AT2, FT2 et PY2 est inférieure ou égale à celle des microcosmes inoculés avec PT1, AT1, FT1 et PY1 aux écarts-types près. Après 50 jours d'incubation, les courbes représentatives des 2 densités d'inoculum se superposent pour un consortium donné.



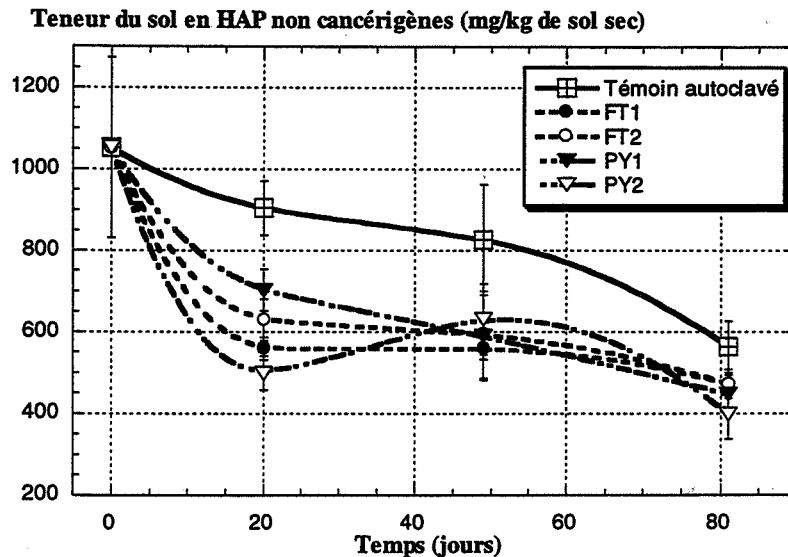


Figure VIII.1.1.2-b : Teneur en HAP non cancérigènes des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY. Les indices 1 et 2 représentent les quantités d'inoculum 1 et 2 respectivement.

En ce qui concerne les HAP cancérigènes, nous n'avons pas mis en évidence de biodégradation par les 4 consortia inoculés dans les microcosmes de sol par rapport au témoin. Nous n'avons représenté que les teneurs en HAP cancérigènes des microcosmes inoculés avec les consortia PT et AT. Les résultats pour les consortia FT et PY sont tout à fait similaires, i.e. aucune dégradation n'a été mise en évidence par rapport au témoin.

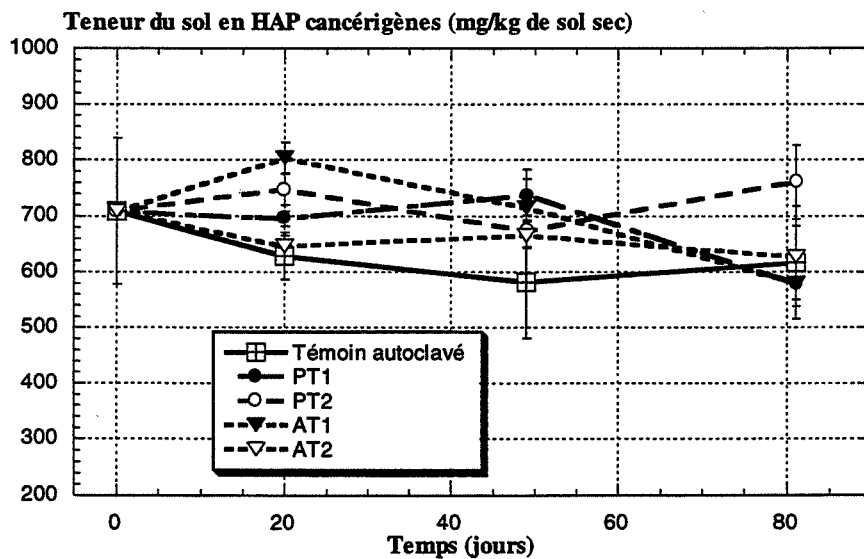


Figure VIII.1.1.2-c : Teneur en HAP cancérigènes des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT. Les indices 1 et 2 représentent les quantités d'inoculum 1 et 2 respectivement.

### VIII.1.1.3 – Bilan

Ainsi, nous avons vu que les consortia sélectionnés au VI sont capables de dégrader des HAP non cancérigènes contenus dans un sol pollué, mais ne sont pas capables de diminuer la teneur en HAP cancérigènes de ce même sol.

Ayant testé 2 quantités d'inoculum, nous en concluons que la quantité la plus élevée (4 ml d'absorbance à 600 nm égale à 1,5 pour 120-130 g de sol sec) est légèrement meilleure pour la biodégradation des HAP non cancérigènes. Aussi, nous utiliserons cette densité d'inoculum dans la suite des expériences.

Nous avons présenté les résultats globaux en termes de HAP non cancérigènes et cancérigènes. Il est toutefois intéressant de se pencher sur le détail de la biodégradation.

En effet, les HAP non cancérigènes regroupent 1 HAP bicyclique (le naphthalène), 5 HAP tricycliques, 2 HAP quadricycliques, 1 HAP pentacyclique et 1 HAP hexacyclique. Les HAP cancérigènes regroupent eux 2 HAP quadricycliques, 3 HAP pentacycliques et 1 HAP hexacyclique.

Nous avons vu au V que la biodégradation des HAP d'une même famille (même nombre de cycles) est souvent similaire et que le nombre de cycles influence l'étendue de la biodégradation : des HAP de 4 cycles ne se dégradent pas comme ceux de 3 cycles, ou de 5 cycles, ...

Nous allons donc nous pencher dans la suite sur la biodégradation de chaque HAP individuellement, avec une seule densité d'inoculum et à deux températures différentes, 23°C et 30°C.

#### **VIII.1.2 – Biodégradation des HAP à 23°C et 30°C dans les microcosmes de sol stérile inoculés avec les consortia PT, AT, FT et PY**

Afin de déterminer les capacités propres des consortia PT, AT, FT et PY envers la dégradation des HAP, ainsi que la nature des HAP ciblés par ces consortia, nous avons procédé à l'inoculation de sol pollué autoclavé avec ces consortia (Bidaud and Tran-Minh, 1998).

Pour cela, 2 séries de microcosmes ont été réalisées : la première incubée à 23°C (dont il a déjà été question au VIII.1.1), la seconde à 30°C. Nous avons en effet vu au V.2 que la biodégradation des HAP est plus rapide à 30°C qu'à 23°C.

Il est donc intéressant de savoir si cela est aussi le cas pour les consortia sélectionnés.

La densité d'inoculum utilisée ici est celle préconisée au VIII.1.1.3, i.e. 4 ml de suspension des consortia d'absorbance à 600 nm ajustée à 1,5 inoculés dans 120-130 g (masse sèche) de sol pollué. L'humidité du sol est ajustée à 20%, le pH est de 7,2 (cf. protocole aux IV.5.1 et IV.5.2).

##### VIII.1.2.1 – Dénombrements sur géloses

Nous avons procédé aux dénombrements sur milieu NB (pH=7,2) de la population microbienne des différents microcosmes inoculés ou non.

Nous remarquons déjà que le réveil de la microflore indigène est moins rapide et moins intense à 30°C qu'à 23°C (Figures VIII.1.2.1-a et -b) : le témoin à 30°C sera donc un meilleur témoin des pertes abiotiques (à 30°C) que le témoin à 23°C (pour les pertes abiotiques à 23°C).

Nous avons inoculé les microcosmes avec des inocula de même densité (absorbance à 600 nm) et en même quantité, mais les allures des dénombrements à 23°C et à 30°C sont radicalement différentes pour un consortium donné.

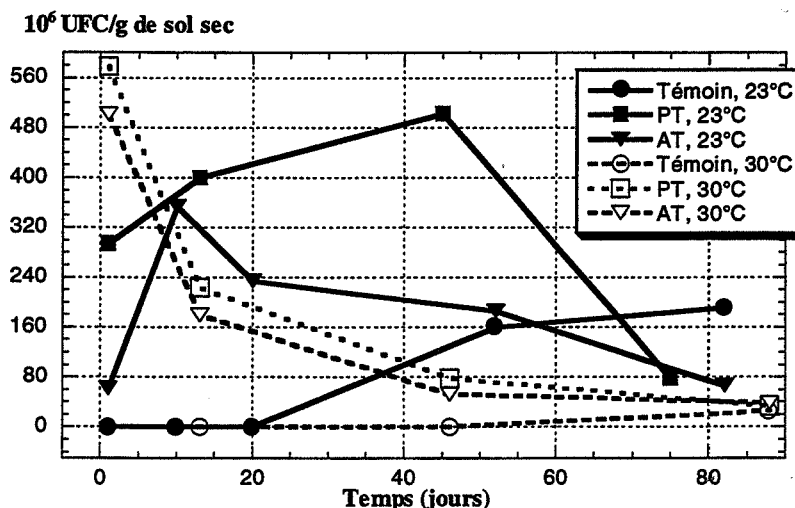


Figure VIII.1.2.1-a : Dénombrement sur milieu NB (pH=7,2) de la population microbienne des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

Ainsi, pour PT, le dénombrement initial (en fait à 1 jour) est de  $560 \cdot 10^6$  UFC/g à 30°C contre  $300 \cdot 10^6$  UFC/g à 23°C. Pour AT, il est de  $490 \cdot 10^6$  UFC/g à 30°C et de  $60 \cdot 10^6$  UFC/g à 23°C (Figure VIII.1.2.1-a).

Ensuite, les évolutions des dénombrements sont différentes. A 30°C, il y a diminution régulière des dénombrements jusqu'à  $40 \cdot 10^6$  UFC/g à 90 jours d'incubation. A 23°C, il y a d'abord une augmentation de la population, puis la décroissance débute pour atteindre un niveau final de population similaire à celui à 30°C.

Nous pouvons faire des commentaires similaires pour FT et PY à la Figure VIII.1.2.1-b. Là, nous remarquons que le maximum atteint par FT à 23°C correspond au dénombrement initial de FT à 30°C.

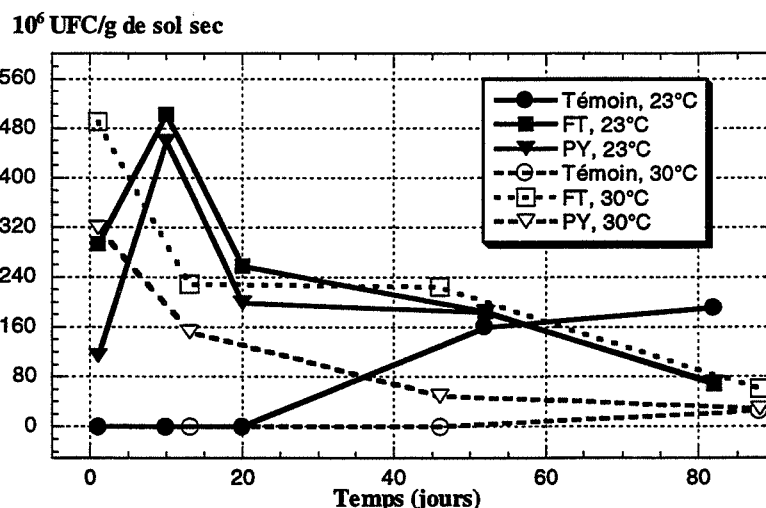


Figure VIII.1.2.1-b : Dénombrement sur milieu NB (pH=7,2) de la population microbienne des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

Or, nous savons que nous avons inoculé les mêmes quantités, pour un consortium donné, à 23°C et à 30°C.

La température d'incubation a donc une grande influence sur la population inoculée dans le sol. A 30°C, l'activité des micro-organismes est peut-être augmentée de manière très

rapide par rapport à 23°C, ce qui peut expliquer les forts dénombrements initiaux (en fait à 1 jour) à 30°C. Toutefois, nous resterons prudents, les problèmes d'homogénéisation et d'échantillonnage semblant à nouveau intervenir sur les dénombrements initiaux comme nous l'avons déjà évoqué au VIII.1.1.1.

#### VIII.1.2.2 – Biodégradation globale des HAP

Nous avons vu au VIII.1.2.1 que le réveil de la microflore indigène a lieu entre 20 et 50 jours d'incubation à 23°C, entre 50 et 80 jours d'incubation à 30°C. En outre, le réveil est plus « faible » (en nombre d'UFC/g de sol) à 30°C. Il est possible que la nature des micro-organismes recolonisant le sol soit différente à 30°C par rapport à 23°C, et que leur remise en activité soit réalisée plus lentement.

Aussi, la biodégradation des HAP non cancérigènes est plus élevée dans le témoin à 23°C qu'à 30°C, pour les temps d'incubation considérés (Figures VIII.1.2.2-a, et -b). Pour les HAP cancérigènes, nous n'observons presque pas de diminution de la teneur dans les deux témoins (Figure VIII.1.2.2-c).

Ainsi, l'inoculation des microcosmes de sol avec les consortia PT, AT, FT et PY induit une biodégradation des HAP non cancérigènes (Figures VIII.1.2.2-a et -b) par rapport aux témoins. L'écart par rapport au témoin est plus élevé à 30°C qu'à 23°C.

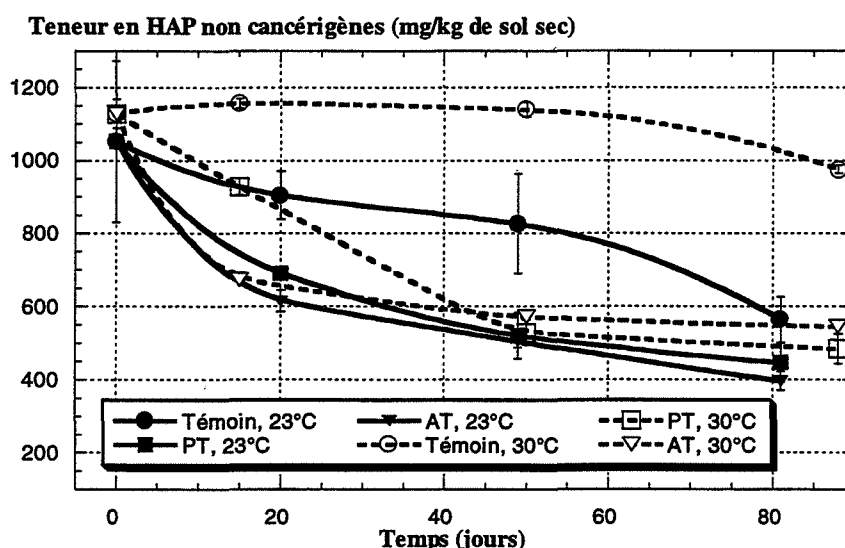


Figure VIII.1.2.2-a : Teneur en HAP non cancérigènes des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

Ceci peut être dû au réveil plus précoce de la microflore indigène à 23°C, qui induit une biodégradation. Nous constatons en effet que la teneur du témoin en HAP non cancérigènes est constante à 30°C tant que les dénombrements n'augmentent pas ; ce témoin est en fait un réel témoin des pertes abiotiques jusqu'à 50 jours d'incubation.

Mais nous devons comparer les teneurs des microcosmes inoculés à 23°C à celle du témoin à 23°C. Jusqu'à 20 jours d'incubation, la différence observée à 23°C avec le témoin est bien représentative de la capacité de dégradation des consortia, à 50 jours aussi sans doute malgré l'augmentation des dénombrements dans le témoin après 20 jours. Elle ne l'est plus à 80 jours d'incubation.

Donc, comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'écart des teneurs en HAP non cancérigènes par rapport au témoin est plus faible à 23°C qu'à 30°C.

Pour PT, l'écart à 20 jours est de 200 mg/kg à 23°C et de 300 mg/kg à 30°C. A 50 jours d'incubation, il est de 400 mg/kg à 23°C et de 600 mg/kg à 30 °C (Figure VIII.1.2.2-a). De même pour AT, l'écart à 20 jours est de 300 mg/kg à 23°C, de 500 mg/kg à 30°C.

La biodégradation des HAP non cancérigènes par PT et AT est donc plus forte à 30°C qu'à 23°C.

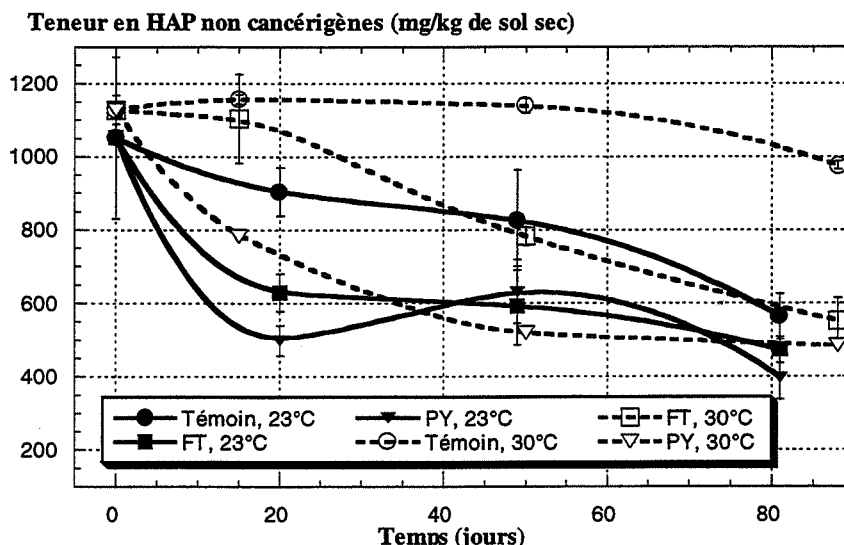


Figure VIII.1.2.2-b : Teneur en HAP non cancérigènes des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

En ce qui concerne FT et PY (Figure VIII.1.2.2-b), les écarts à 20 jours sont de 250 mg/kg à 23°C et 100 mg/kg à 30°C pour FT, 400 mg/kg à 23°C et 450 mg/kg à 30°C pour PY. A 50 jours d'incubation, ils sont de 250 mg/kg à 23°C et 300 mg/kg à 30°C pour FT, 200 mg/kg à 23°C et 600 mg/kg à 30°C pour PY.

La biodégradation des HAP non cancérigènes semble donc accélérée à 30°C par rapport à 23°C pour les consortia PT, AT et PY. Cette différence de température semble avoir un effet différent sur FT : la biodégradation est plutôt accélérée à 23°C par rapport à 30°C.

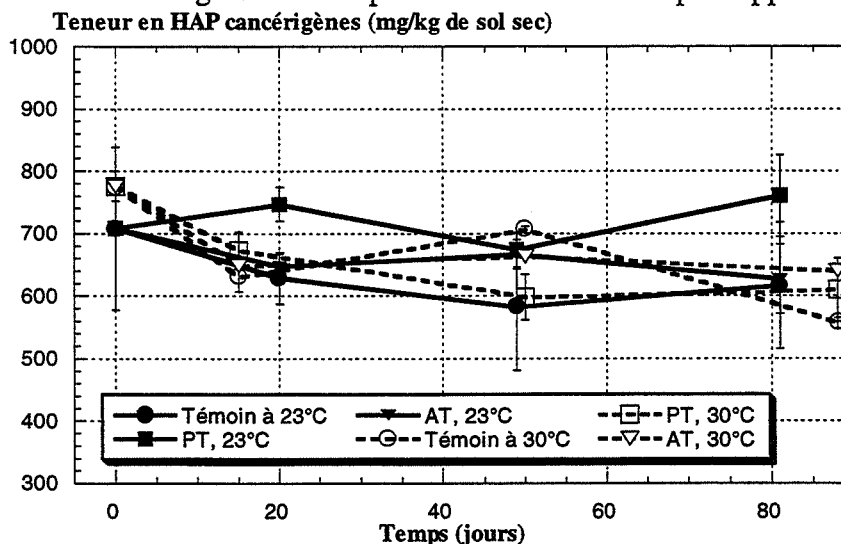


Figure VIII.1.2.2-c : Teneur en HAP cancérigènes des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

Pour les HAP cancérigènes, les teneurs sont presque similaires dans les témoins et dans les microcosmes inoculés, quels que soient les consortia utilisés et aux deux

températures étudiées. Nous illustrons ce phénomène par la Figure VIII.1.2.2-c sur les consortia PT et AT, les résultats étant identiques pour FT et PY.

Il semble donc que les consortia PT, AT, FT et PY sélectionnés ne soient pas capables de dégrader les HAP cancérigènes, que ce soit à 23°C (comme nous l'avons vu au VIII.1.1.2) ou à 30°C.

Nous allons donc dans la suite étudier la dégradation des 16 HAP cibles de manière plus détaillée.

#### VIII.1.2.3 – Biodégradation par famille de HAP

Comme nous l'avons fait au V, nous allons étudier la biodégradation des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. individuellement.

Comme les teneurs initiales en ces 16 HAP diffèrent un peu dans les 2 séries (à 23°C et à 30°C) d'essais menés, pour les mêmes raisons qu'au V.1, i.e. les 2 séries n'ont pas pu être menées simultanément, nous représenterons la biodégradation des HAP de 2, 3 et 4 cycles par leur taux de dégradation en %.

Nous pourrions cette fois sans problème comparer les résultats des 2 séries d'essais car les différences des teneurs moyennes initiales sont en fait assez faibles si nous tenons compte des écarts-types.

A chaque sous-partie qui suit, nous indiquerons la teneur initiale en HAP en mg/kg de sol sec, ainsi que les teneurs à 15 ou 20 jours et 50 jours dans les différents microcosmes (Tableaux VIII.1.2.3.1-a, VIII.1.2.3.2-a et VIII.1.2.3.3-a).

##### *VIII.1.2.3.1 – Naphtalène, acénaphthylène, acénaphène*

En ce qui concerne le naphtalène, sa disparition du sol est plus rapide (en regardant la teneur à 20 et 15 jours à 23°C et 30°C respectivement) en présence des différents consortia que dans les témoins, que ce soit à 23°C ou à 30°C. Etant donné les écarts-types calculés pour le naphtalène, l'apport des différents consortia peut être considéré comme équivalent (Tableau VIII.1.2.3.1-a).

Nous n'avons pas donné les teneurs à 80 jours dans le Tableau VIII.1.2.3.1-a, ni dans les Tableaux VIII.1.2.3.2-a, VIII.1.2.3.3-a. Il y a deux raisons à cela. La première est que l'écart au témoin dans les microcosmes inoculés n'est pas représentatif de la biodégradation des HAP par les consortia inoculés, comme nous l'avons vu précédemment. La seconde est la taille des tableaux et leur lisibilité.

L'augmentation de température de 23°C à 30°C n'améliore pas la biodégradation du naphtalène par rapport aux témoins. Dans les microcosmes inoculés, les teneurs en naphtalène à 15, 20 et 50 jours sont inférieures à celles des témoins, mais les valeurs des écarts-types ne permettent pas réellement d'affirmer que les consortia sont capables de dégrader le naphtalène.

Les teneurs initiales en acénaphthylène des microcosmes sont respectivement de 16,7±3,8mg/kg dans la série à 23°C et de 14,4±2,4 mg/kg dans la série à 30°C (Tableau VIII.1.2.3.1-a).

Teneurs (mg/kg de sol sec)					
		Jours	Naphtalène	Acénaphtylène	Acénaphtène
23°C	Témoïn	0	7,0±2,6	16,7±3,8	19,0±7,3
		20	6,7±2,2	14,6±1,6	14,5±1,7
		50	4,1±0,3	13,4±2,4	10,1±0,9
	PT	20	3,6±0,8	8,9±2,0	8,2±4,0
		50	4,2±1,6	5,0±2,1	4,3±0,4
	AT	20	4,0±0,5	10,6±1,6	11,5±1,6
		50	3,5±0,4	7,6±0,1	13,2±1,9
	FT	20	3,7±0,3	8,5±0,3	13,0±1,1
		50	3,8±0,3	7,3±0,4	11,8±2,1
	PY	20	2,8±1,2	7,4±0,1	11,7±3,0
50		7,5±2,3	9,3±2,2	15,0±1,9	
30°C	Témoïn	0	9,9±1,1	14,4±2,4	9,5±3,2
		15	7,6±0,4	9,5±0,2	3,8±1,9
		50	6,4±0,3	7,8±0,1	3,5±1,2
	PT	15	5,4±0,2	1,8±0,1	3,6±1,5
		50	5,0±0,5	1,5±0,1	1,5±0,1
	AT	15	3,4±1,0	3,4±0,3	4,7±0,6
		50	5,1±1,5	2,8±0,4	4,6±0,5
	FT	15	4,9±0,1	8,1±0,9	4,0±0,5
		50	4,8±0,1	5,2±0,1	3,6±1,0
	PY	15	6,3±0,5	3,5±0,3	4,1±0,2
50		4,9±0,7	3,6±0,1	4,0±0,2	

**Tableau VIII.1.2.3.1-a : Teneurs (mg/kg de sol sec) en naphtalène, acénaphtylène et acénaphtène des microcosmes de sol inoculés ou non avec PT, AT, PY et FT.**

Les pertes en acénaphtylène sont plus élevées dans le témoin à 30°C que dans celui à 23°C (Figures VIII.1.2.3.1-a et -b). Cela correspond sans doute à une augmentation des pertes abiotiques avec l'élévation de la température, car l'acénaphtylène est l'un des HAP les plus volatils.

Aussi, aux deux températures étudiées, l'addition d'inoculum des 4 consortia provoque une biodégradation de l'acénaphtylène.

Le taux de dégradation maximal (calculé par rapport à la teneur initiale) est de 90% pour PT à 30°C (Figure VIII.1.2.3.1-a), soit une teneur finale de 1,5 mg/kg contre 14,4 mg/kg initialement. Pour AT, il est de 80% à 50 jours à 30°C, soit une teneur de 2,8 mg/kg.

Pour FT et PY, le taux de dégradation maximal est de 85% en fin d'incubation à 30°C (Figure VIII.1.2.3.1-b).

En termes de teneurs en acénaphtylène (Tableau VIII.1.2.3.1-a), les teneurs finales (pertes biotiques et abiotiques cumulées) sont plus basses à 30°C qu'à 23°C.

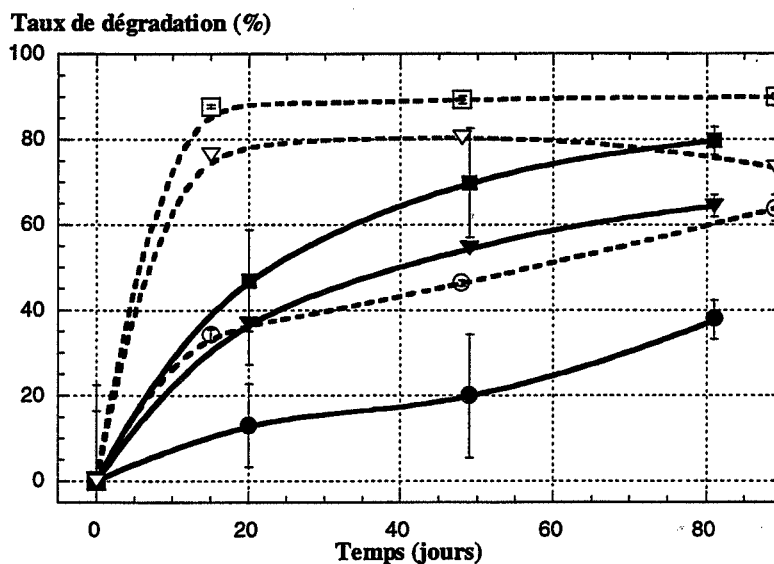


Figure VIII.1.2.3.1-a : Taux de dégradation de l'acénaphthylène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

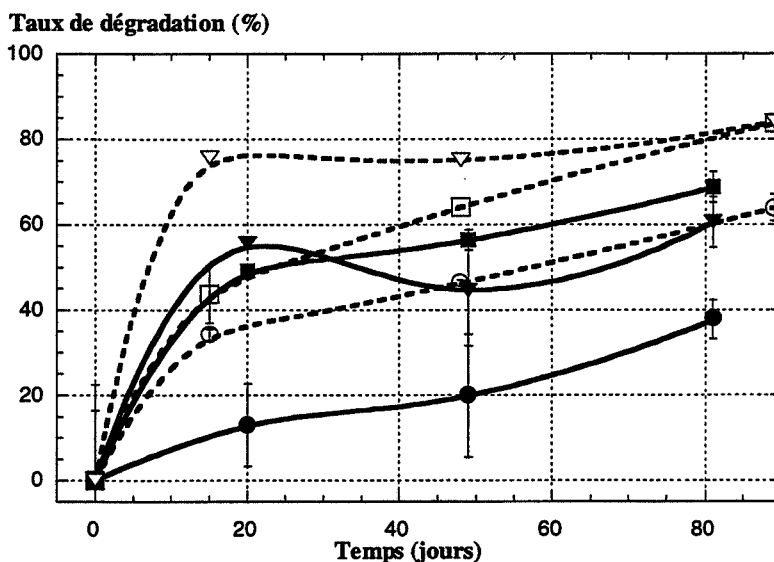


Figure VIII.1.2.3.1-b : Taux de dégradation de l'acénaphthylène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : FT ; ▼ : PY. A 30°C, ○ : témoin ; □ : FT ; ▽ : PY.

Nous devons toutefois faire des comparaisons relatives pour déterminer la biodégradation par rapport aux témoins afin de mesurer les capacités propres des consortia, en prenant donc en compte les pertes abiotiques, et biotiques dues au réveil de la microflore, dans les témoins.

Ainsi, pour PT, nous atteignons  $1,5 \pm 0,1$  mg/kg d'acénaphthylène à 50 jours à 30°C contre  $5,0 \pm 2,1$  à 23°C. Par rapport aux témoins, cela correspond à une dégradation de 81% à 30°C et de 63% à 23°C. Nous avons résumé les résultats obtenus dans le Tableau VIII.1.2.3.1-b.



Taux de dégradation par rapport au témoin (%)				
	20 jours		50 jours	
	23°C	30°C	23°C	30°C
PT	39	81	63	81
AT	27	64	43	64
FT	42	15	45	33
PY	49	63	30	54

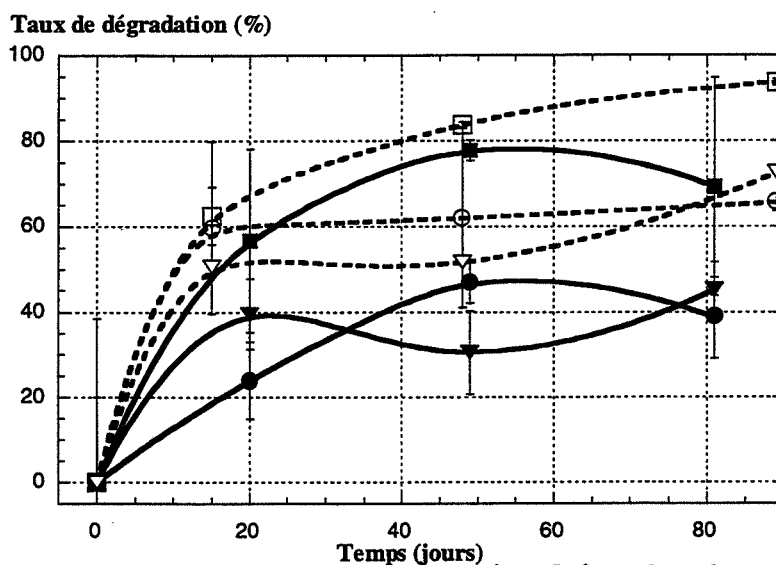
**Tableau VIII.1.2.3.1-b :** Calcul du taux de dégradation de l'acénaphthylène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés. Pour une température donnée, le calcul est réalisé comme suit :

$$\% \text{ calculé} = (\text{teneur dans le témoin à } t - \text{teneur dans le microcosme à } t) / (\text{teneur dans le témoin à } t) \times 100.$$

Donc, en tenant compte des pertes dans les témoins, nous constatons que la biodégradation de l'acénaphthylène par les consortia PT, AT et PY est plus élevée à 30°C qu'à 23°C. Après 50 jours d'incubation, la dégradation par rapport aux témoins se situe entre 50 et 80% pour ces 3 consortia.

Par contre, la biodégradation de l'acénaphthylène par FT est plus élevée à 23°C qu'à 30°C.

Pour l'acénaphthène, nous voyons à la Figure VIII.1.2.3.1-c que l'addition de AT n'a pas d'influence sur sa dégradation à 23°C ou à 30°C. Il en est de même pour FT et PY (voir les teneurs Tableau VIII.1.2.3.1-a) que nous n'avons pas représentés, en tenant compte des écarts-types.



**Figure VIII.1.2.3.1-c :** Taux de dégradation de l'acénaphthène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

Par contre, une dégradation de l'acénaphthène par rapport aux témoins est mise en évidence dans les microcosmes inoculés avec PT (Figure VIII.1.2.3.1-c).

Si nous nous reportons au Tableau VIII.1.2.3.1-a, nous voyons que les teneurs en acénaphthène des microcosmes inoculés avec PT sont à 50 jours de 4,3±0,4 mg/kg à 23°C et 1,5±0,1 mg/kg à 30°C contre 10,1±0,9 mg/kg et 3,5±1,2 mg/kg dans les témoins à 23°C et 30°C respectivement. Cela représente un taux de dégradation (par rapport aux témoins) de 57% aux deux températures.

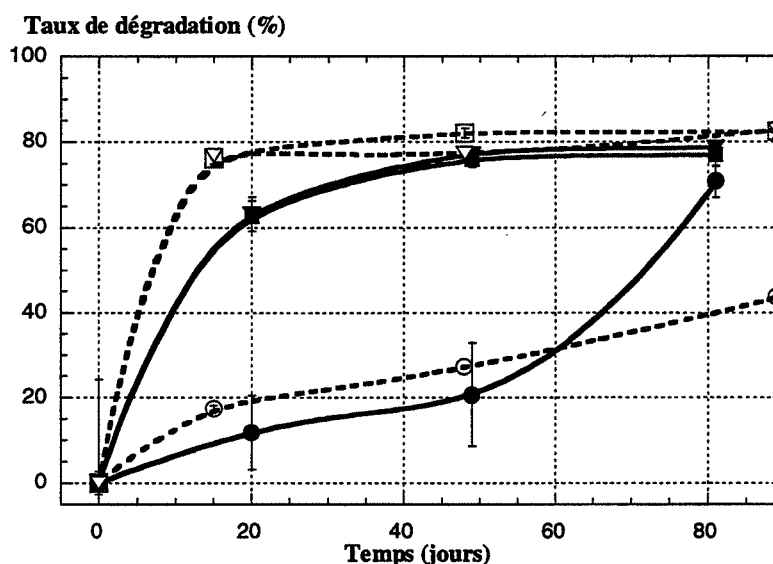
Pour les microcosmes inoculés avec les autres consortia, les teneurs en acénaphène à 50 jours d'incubation sont supérieures ou égales à celles des témoins (Tableau VIII.1.2.3.1-a) aux deux températures étudiées.

Nous remarquerons en outre que les pertes par rapport à la teneur initiale en acénaphène dans le témoin à 30°C sont bien plus élevées que dans le témoin à 23°C. Si l'on se reporte au Tableau VIII.1.2.3.1-a, un calcul rapide nous montre que les pertes à 20 jours sont de 24% à 23°C contre 60% à 15 jours à 30°C et à 50 jours les pertes sont de 47% à 23°C contre 63% à 30°C.

#### VIII.1.2.3.2 – 3 cycles : fluorène, phénanthrène, anthracène

Les pertes (en %) de fluorène sont supérieures dans le témoins à 30°C par rapport au témoin à 23°C jusqu'à 50 jours d'incubation (Figures VIII.1.2.3.2-a et -b).

Ensuite, l'augmentation brutale des pertes dans le témoin à 23°C est due au « réveil » de la microflore indigène, comme nous l'avons vu au VIII.1.2.1.



**Figure VIII.1.2.3.2-a :** Taux de dégradation du fluorène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

Ainsi, à 23°C et 30°C, une biodégradation du fluorène due à l'inoculation avec les consortia est mise en évidence. Nous voyons à la Figure VIII.1.2.3.2-a que sa biodégradation est du même ordre pour PT et AT, ce aux deux températures étudiées. A 50 jours d'incubation, alors que sa perte est de l'ordre de 20% et de 25% dans les témoins à 23°C et à 30°C respectivement, elle est de 75% à 23°C et de 80% à 30°C dans les microcosmes inoculés avec PT ou AT.

Par contre, pour FT et PY, alors que les pertes dans les microcosmes sont similaires à 23°C, la dégradation du fluorène par FT est moins bonne à 30°C qu'à 23°C (comme pour l'acénaphylène).

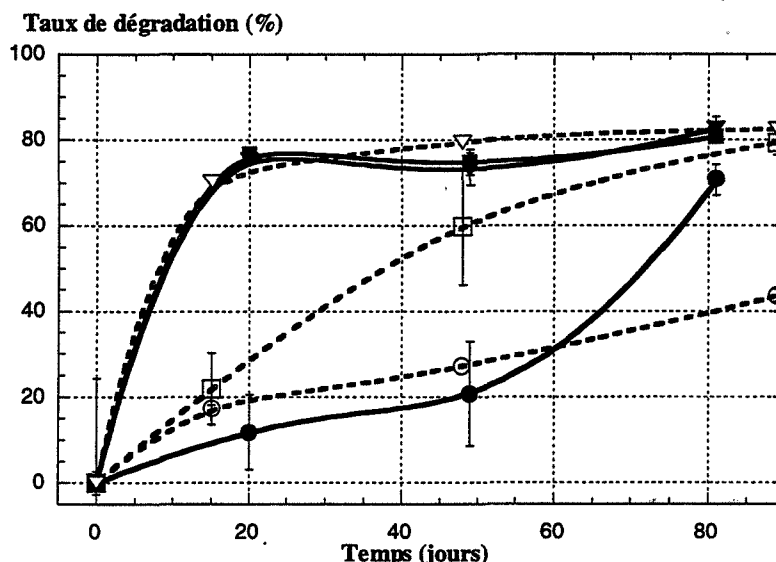


Figure VIII.1.2.3.2-b : Taux de dégradation du fluorène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : FT ; ▼ : PY. A 30°C, ○ : témoin ; □ : FT ; ▽ : PY.

		Teneur (mg/kg de sol sec)			
		Jours	Fluorène	Phénanthrène	Anthracène
23°C	Témoin	0	77,9±18,9	214,1±52,2	124,3±24,2
		20	68,7±6,8	198,9±13,3	111,7±8,7
		50	61,7±9,4	184,5±29,5	102,0±15,9
	PT	20	29,1±2,8	73,1±0,1	58,5±0,7
		50	18,8±1,4	56,7±0,9	45,0±3,0
	AT	20	28,6±3,1	83,3±6,1	61,1±1,1
		50	17,8±0,7	56,2±1,1	37,5±1,2
	FT	20	18,1±0,6	56,8±1,6	62,4±2,5
		50	19,6±2,3	59,0±10,3	55,6±7,3
PY	20	19,1±0,7	56,0±4,8	61,3±4,6	
	50	20,9±3,0	60,2±7,6	65,9±9,1	
30°C	Témoin	0	60,4±1,6	192,9±4,7	108,4±2,7
		15	49,9±0,5	186,6±1,1	102,3±0,4
		50	44,0±0,2	179,8±2,2	91,7±1,0
	PT	15	14,5±0,6	52,0±1,9	45,8±1,2
		50	10,9±0,7	42,7±2,4	26,4±1,2
	AT	15	14,0±0,8	55,0±3,6	37,8±3,1
		50	13,7±1,2	48,6±3,7	35,9±4,0
	FT	15	47,2±5,0	181,8±15,5	96,6±7,6
		50	24,3±8,2	71,4±2,4	71,7±0,8
PY	15	18,0±1,5	71,8±7,2	55,6±2,6	
	50	12,4±1,7	43,7±9,6	25,2±4,7	

Tableau VIII.1.2.3.2-a : Teneurs (mg/kg de sol sec) en fluorène, phénanthrène, et anthracène des microcosmes de sol inoculés ou non avec PT, AT, PY et FT.

Les pertes à 50 jours en fluorène des témoins sont de 21% et 27% à 23°C et 30°C respectivement. Elles sont donc bien plus faibles que pour les HAP décrits au VIII.1.2.3.1. Les pertes abiotiques en fluorène sont plus faibles, sans doute à cause de sa plus faible volatilisation.

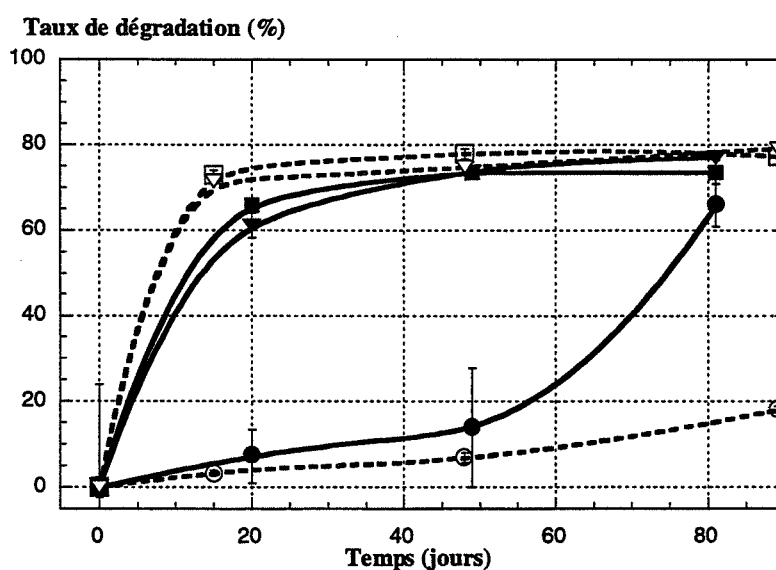
A partir du Tableau VIII.1.2.3.2-a, nous pouvons calculer la dégradation du fluorène imputable aux consortia en tenant compte des pertes dans les témoins comme nous l'avons fait pour l'acénaphthylène au Tableau VIII.1.2.3.1-b. Les résultats de ce calcul sont donnés au Tableau VIII.1.2.3.2-b pour le fluorène. Nous ferons le même calcul pour le phénanthrène et l'antracène aux Tableaux VIII.1.2.3.2-c et -d respectivement.

Ainsi, nous voyons bien que la biodégradation du fluorène due à FT est meilleure (tout au moins plus rapide) à 23°C qu'à 30°C, surtout à 20 jours d'incubation. Par contre pour PT et AT, elle est plus rapide à 30°C (meilleure à 20 jours, similaire à 50 jours). Quant à PY, la différence de température n'influence presque pas son action sur le fluorène.

Taux de dégradation par rapport au témoin (%)				
	20 jours		50 jours	
	23°C	30°C	23°C	30°C
PT	58	71	70	75
AT	58	72	71	69
FT	74	5	68	45
PY	72	64	66	72

**Tableau VIII.1.2.3.2-b :** Calcul du taux de dégradation du fluorène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés. Pour une température donnée, le calcul est réalisé comme suit : % calculé = (teneur dans le témoin à t - teneur dans le microcosme à t) / (teneur dans le témoin à t) x 100.

En ce qui concerne la biodégradation du phénanthrène, les profils des courbes obtenues (Figures VIII.1.2.3.2-c et -d) sont similaires à ceux du fluorène. Le maximum de dégradation atteint est de 80% de la teneur initiale. L'augmentation du taux de dégradation du phénanthrène par PT et AT est légèrement plus rapide à 30°C qu'à 23°C (Figure VIII.1.2.3.2-c).



**Figure VIII.1.2.3.2-c :** Taux de dégradation du phénanthrène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

Ces taux de dégradation sont très proches aux deux températures dans les microcosmes inoculés avec PY (Figure VIII.1.2.3.2-d). Par contre, l'augmentation de température à 30°C a un effet négatif sur la dégradation du phénanthrène par FT.

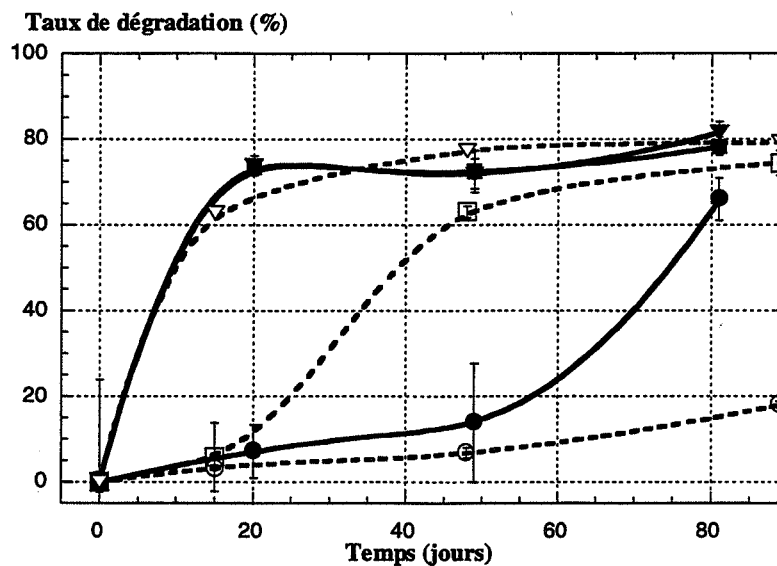


Figure VIII.1.2.3.2-d : Taux de dégradation du phénanthrène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : FT ; ▼ : PY. A 30°C, ○ : témoin ; □ : FT ; ▽ : PY.

Les pertes en phénanthrène à 50 jours des témoins sont de 14% et 7% par rapport à la teneur initiale à 23°C et 30°C respectivement. Elles sont inférieures à celles en fluorène évoquées précédemment.

L'étendue de la dégradation du phénanthrène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés a été calculée au Tableau VIII.1.2.3.2-c à partir du Tableau VIII.1.2.3.2-a.

Taux de dégradation par rapport au témoin (%)				
	20 jours		50 jours	
	23°C	30°C	23°C	30°C
PT	63	72	69	76
AT	58	70	70	73
FT	71	3	68	60
PY	72	62	67	76

Tableau VIII.1.2.3.2-c : Calcul du taux de dégradation du phénanthrène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés. Pour une température donnée, le calcul est réalisé comme suit : % calculé = (teneur dans le témoin à t - teneur dans le microcosme à t) / (teneur dans le témoin à t) x 100.

A 15 et 20 jours d'incubation, comme pour le fluorène, la biodégradation du phénanthrène est plus élevée (accélérée) à 30°C dans les microcosmes inoculés avec PT et AT, similaire aux deux températures dans les microcosmes inoculés avec PY (la mesure à 23°C étant faite à 20 jours, celle à 30°C à 15 jours) et bien plus faible (ralentie) à 30°C dans le microcosme inoculé avec FT. Après 50 jours d'incubation, les différences sont estompées.

Pour l'anthracène, les profils de dégradation sont un peu différents de ceux du fluorène et du phénanthrène. Notamment, la température semble avoir plus d'influence sur la biodégradation de l'anthracène par les consortia. En outre, jusqu'à 50 jours, les pertes dans les témoins à 23°C et à 30°C sont identiques en tenant compte des écarts-types (Figures

VIII.1.2.3.2-e et -f). A 50 jours, les pertes dans les témoins sont égales à 18% et 15% de la teneur initiale en anthracène à 23°C et à 30°C respectivement. Elles sont donc relativement du même ordre que pour le fluorène et le phénanthrène.

Les biodégradations de l'anthracène dues à PT et AT sont identiques jusqu'à 20 jours à 23°C, puis celle due à AT devient supérieure à celle due à PT (Figure VIII.1.2.3.2-e). Par contre, à 30°C, la biodégradation de l'anthracène due à AT est supérieure à celle due à PT à 15 jours, cette tendance étant inversée à 50 jours (les taux restant toutefois voisins).

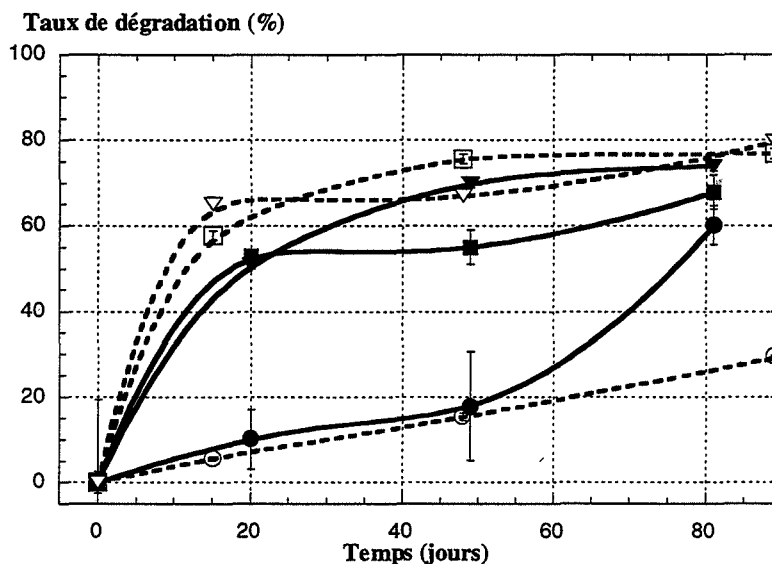


Figure VIII.1.2.3.2-e : Taux de dégradation de l'anthracène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

Pour les microcosmes inoculés avec FT et PY, les taux de dégradation de l'anthracène à 23°C sont presque identiques (Figure VIII.1.2.3.2-f). Mais, à 30°C la biodégradation de l'anthracène par PY est accélérée par l'augmentation de température, alors que celle due à FT est ralentie, comme nous l'avons déjà observé pour le fluorène et le phénanthrène.

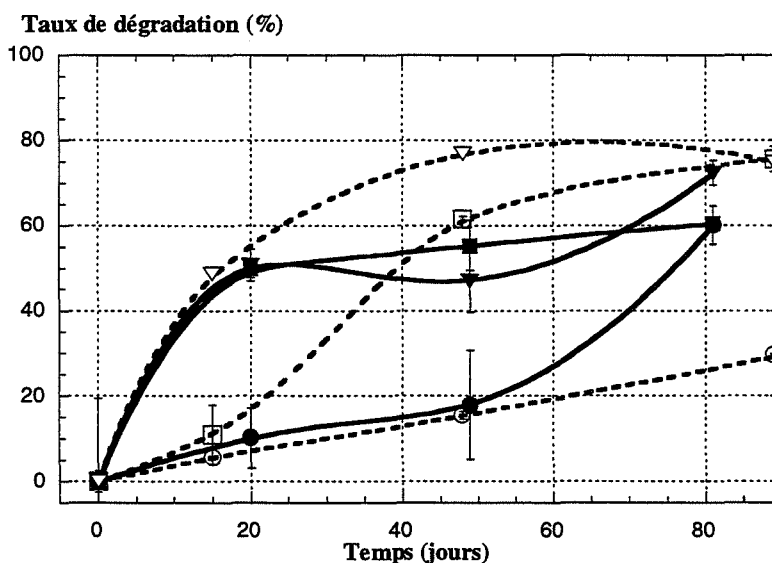


Figure VIII.1.2.3.2-f : Taux de dégradation de l'anthracène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : FT ; ▼ : PY. A 30°C, ○ : témoin ; □ : FT ; ▽ : PY.

L'étendue de la dégradation de l'anthracène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés a été calculée au Tableau VIII.1.2.3.2-d à partir du Tableau VIII.1.2.3.2-a.

Taux de dégradation par rapport au témoin (%)				
	20 jours	15 jours	50 jours	
	23°C	30°C	23°C	30°C
PT	48	55	56	71
AT	45	63	63	60
FT	44	5	45	22
PY	45	45	35	72

**Tableau VIII.1.2.3.2-d** : Calcul du taux de dégradation de l'anthracène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés. Pour une température donnée, le calcul est réalisé comme suit : % calculé = (teneur dans le témoin à t - teneur dans le microcosme à t) / (teneur dans le témoin à t) x 100.

Comme pour le fluorène et le phénanthrène, à 15 et 20 jours d'incubation, la biodégradation de l'anthracène est plus élevée (accélérée) à 30°C dans les microcosmes inoculés avec PT et AT, similaire aux deux températures dans les microcosmes inoculés avec PY et bien plus faible (ralentie) à 30°C dans le microcosme inoculé avec FT.

A 50 jours d'incubation, la biodégradation due à PY et PT est supérieure à 30°C : les teneurs en anthracène sont d'ailleurs de 65,9 mg/kg à 23°C et de 25,2 mg/kg à 30°C (Table VIII.1.2.3.2-a) pour PY et de 45,0 mg/kg à 23°C et de 26,4 mg/kg à 30°C pour PT. La teneur en anthracène à 50 jours est donc réduite environ de moitié à 30°C par rapport à 23°C.

Pour AT, les teneurs en anthracène à 50 jours sont du même ordre (36 mg/kg environ). Pour FT, à 30°C, les teneurs des microcosmes inoculés sont plus élevées à 50 jours que pour les autres consortia inoculés. La biodégradation est plus élevée à 23°C qu'à 30°C : les teneurs à 50 jours sont de 55,6 mg/kg à 23°C contre 71,7 mg/kg à 30°C.

En conclusion pour les HAP de 3 cycles, une biodégradation due à l'inoculation par les consortia PT, AT, FT et PY a effectivement été mise en évidence dans les microcosmes de sol pollué autoclavé inoculés.

Les effets de l'augmentation de température de 23°C à 30°C diffèrent en fonction du consortium considéré. Elle accélère la biodégradation des HAP de 3 cycles (fluorène, phénanthrène et anthracène) par les consortia PT et AT, a relativement peu d'effet sur PY (sauf pour l'anthracène où il y a amélioration) et ralentit la biodégradation due à FT.

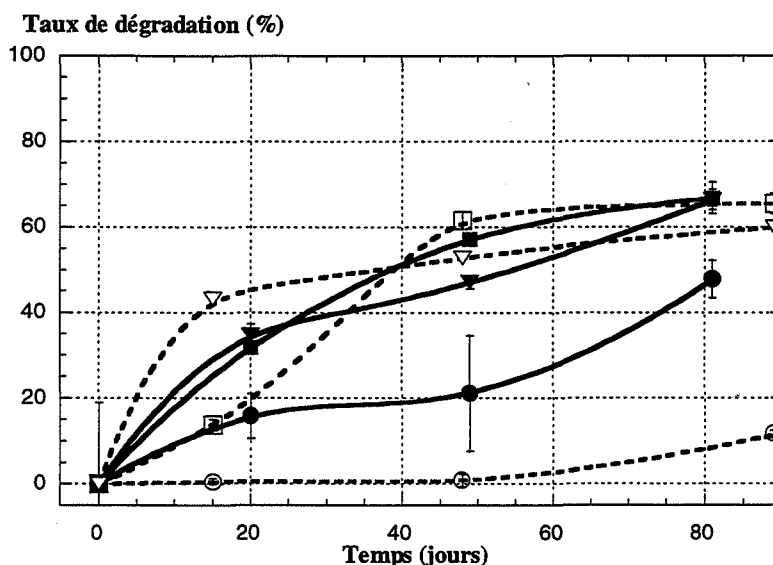
A 23°C, en prenant en compte les pertes dans les témoins, les taux de dégradation du fluorène, du phénanthrène et de l'anthracène sont de l'ordre de 70%, 70% et 45-65% respectivement (Tableaux VIII.1.2.3.2-b, -c et -d) pour les 4 consortia.

#### VIII.1.2.3.3 – 4 cycles : fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène

Les pertes en fluoranthène des témoins par rapport aux teneurs initiales à 23°C et à 30°C sont assez différentes : à 50 jours d'incubation, elles sont de 20% à 23°C et de 1% seulement à 30°C (calculs d'après le Tableau VIII.1.2.3.3-a). Les pertes sont donc paradoxalement plus élevées à 23°C qu'à 30°C. Ceci est dû au réveil plus précoce de la microflore indigène à 23°C, et donc à des pertes biotiques dans le témoin à 23°C, pertes biotiques qui n'existent pas à 30°C.

Les taux de dégradation du fluoranthène sont très similaires à 23°C pour PT et AT, mais des différences apparaissent à 30°C (Figure VIII.1.2.3.3-a). La dégradation est en effet

plus performante à 15 jours pour AT à 30°C (45% de dégradation contre 15% pour PT), mais l'effet est inversé à 50 jours d'incubation.

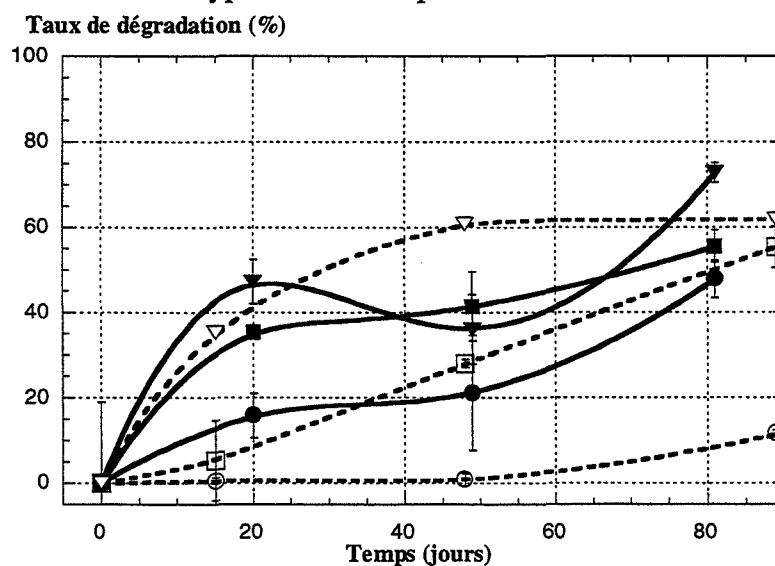


**Figure VIII.1.2.3.3-a :** Taux de dégradation du fluoranthène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

Pour FT, la dégradation apparaît plus lentement à 30°C qu'à 23°C : elle est de 5% à 15 jours à 30°C, contre 30% à 23°C. Aux deux températures étudiées, les courbes représentatives de la dégradation du fluoranthène par les consortia FT et PY sont bien distinctes (Figure VIII.1.2.3.3-b). Ce n'était pas le cas à 23°C pour la dégradation du fluorène, du phénanthrène et de l'antracène (Figures VIII.1.2.3.2-b, -d et -f) où elles étaient presque confondues.

Les courbes de dégradation de PY à 23°C et 30°C se superposent jusqu'à 20 jours, mais les pourcentages de dégradation sont différents à 50 jours. Si nous prenons en compte l'écart-type à 50 jours sur la courbe de PY à 23°C, la différence entre les deux courbes est nettement estompée car cet écart-type est assez important.



**Figure VIII.1.2.3.3-b :** Taux de dégradation du fluoranthène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : FT ; ▼ : PY. A 30°C, ○ : témoin ; □ : FT ; ▽ : PY.



		Teneurs (mg/kg de sol sec)				
		Jours	Fluoranthène	Pyrène	Benzo(a)anthracène	Chrysène
23°C	Témoins	0	366,8±69,7	73,5±14,2	167,8±31,2	149,3±33,7
		20	308,9±18,7	56,2±3,7	155,4±7,2	143,0±8,3
		50	289,0±49,3	51,2±6,8	143,9±24,6	133,8±23,8
	PT	20	250,1±0,6	109,9±1,6	176,1±1,8	166,6±1,9
		50	157,2±2,5	60,7±0,9	161,6±1,4	151,8±2,0
	AT	20	239,4±9,4	60,8±1,7	143,2±2,8	141,2±0,9
		50	194,2±5,3	52,2±1,6	161,7±6,2	152,8±5,0
	FT	20	237,1±4,3	80,7±4,3	159,1±0,1	148,8±0,4
		50	215,1±29,3	55,3±5,6	175,3±18,8	166,6±19,1
	PY	20	193,8±19,3	42,7±6,2	136,2±11,6	128,8±9,5
50		234,9±30,0	43,7±4,8	201,3±27,6	192,5±27,2	
30°C	Témoins	0	393,4±5,2	174,1±2,6	145,6±5,8	151,2±2,7
		15	391,5±2,6	169,1±2,6	137,5±2,7	143,3±4,2
		50	390,2±5,4	156,1±3,1	146,0±2,3	158,8±1,6
	PT	15	339,7±5,0	211,0±1,6	143,3±6,1	148,2±2,8
		50	151,6±7,8	72,2±4,0	129,4±7,9	135,8±8,0
	AT	15	223,6±17,4	90,8±5,8	141,5±12,3	144,7±14,6
		50	186,0±16,8	47,6±4,4	140,8±17,3	157,7±19,3
	FT	15	372,5±37,0	162,1±15,6	132,4±19,2	144,1±14,8
		50	283,1±3,9	118,7±1,4	135,8±0,6	144,6±1,3
	PY	15	254,4±13,0	130,3±9,4	161,8±1,6	155,5±0,8
50		154,5±26,5	51,9±9,2	127,3±20,0	135,4±19,4	

Tableau VIII.1.2.3.3-a : Teneurs (mg/kg de sol sec) en fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène et chrysène des microcosmes de sol inoculés ou non avec PT, AT, PY et FT.

Le taux de dégradation du fluoranthène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés est présenté au Tableau VIII.1.2.3.3-b, et calculé à partir du Tableau VIII.1.2.3.3-a.

Taux de dégradation par rapport au témoin (%)						
	20 jours		15 jours		50 jours	
	23°C	30°C	23°C	30°C	23°C	30°C
PT	19	14	46	61		
AT	22	43	32	52		
FT	23	5	26	27		
PY	37	35	18	60		

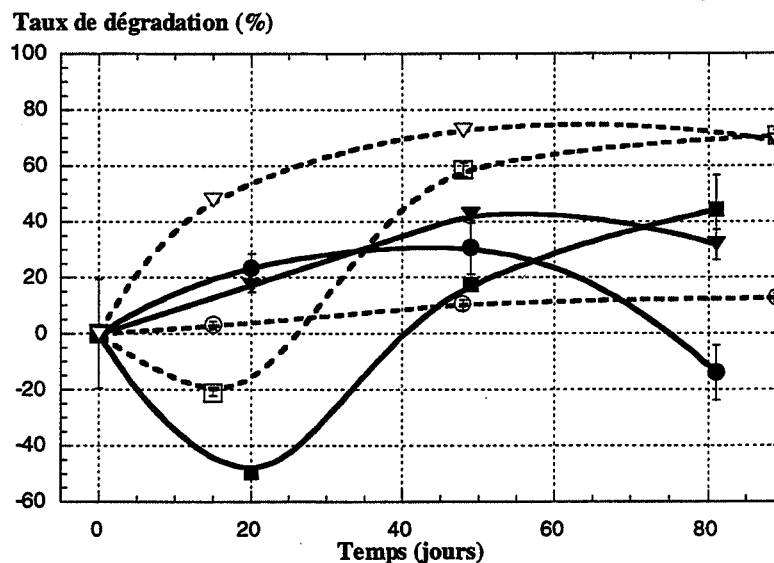
Tableau VIII.1.2.3.3-b : Calcul du taux de dégradation du fluoranthène par rapport aux témoins dans les microcosmes inoculés. Pour une température donnée, le calcul est réalisé comme suit : % calculé = (teneur dans le témoin à t - teneur dans le microcosme à t) / (teneur dans le témoin à t) x 100.

La biodégradation à 15 et 20 jours du fluoranthène par FT est moins bonne à 30°C qu'à 23°C (ralentie à 30°C), mais est du même ordre à 50 jours. Pour PT et PY, elle est équivalente au départ, mais à 50 jours elle est plus élevée à 30°C. La biodégradation du fluoranthène par AT est augmentée par l'élévation de température de 23°C à 30°C.

A 50 jours d'incubation à 30°C, le fluoranthène est dégradé de 52 à 61% par les consortia AT, PT et PY, ce qui est nettement plus qu'à 23°C. Sa dégradation par FT n'est que de 27% par rapport au témoin aux deux températures étudiées.

En ce qui concerne le pyrène, il n'y a pas d'effet de l'addition de AT sur sa biodégradation à 23°C jusqu'à 50 jours d'incubation (Figure VIII.1.2.3.3-c et Tableau VIII.1.2.3.3-a). Pour PT, la teneur à 20 jours est même supérieure à la teneur initiale, pour être sensiblement égale au témoin à 50 jours. Le point à 20 jours semble être un point aberrant, car aucune évolution similaire n'a été observée dans toutes nos expériences.

Par contre, une biodégradation spécifique du pyrène par les consortia PT et AT à 30°C et à 50 jours est nettement mise en évidence dans les microcosmes inoculés avec ces consortia (Figure VIII.1.2.3.3-c).



**Figure VIII.1.2.3.3-c :** Taux de dégradation du pyrène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : PT ; ▼ : AT. A 30°C, ○ : témoin ; □ : PT ; ▽ : AT.

Pour PY, il semble qu'il y ait une biodégradation du pyrène à 23°C, mais pas pour FT jusqu'à 50 jours d'incubation (Figure VIII.1.2.3.3-d).

A 30°C, il y a dégradation du pyrène par PY et FT (seulement après 15 jours pour FT).

Ces observations sont plus claires en se reportant au Tableau VIII.1.2.3.3-a, où nous n'observons pas de baisse des teneurs en pyrène des microcosmes inoculés avec PT, AT et FT par rapport au témoin, à 23°C et où une diminution légère apparaît dans le microcosme inoculé avec PY jusqu'à 50 jours.

Par contre, à 30°C, la biodégradation du pyrène par les 4 consortia est bien évidente au Tableau VIII.1.2.3.3-a : déjà à 15 jours pour AT, et seulement à 50 jours pour PT, FT et PY (de manière très nette). Les teneurs à 50 jours dans les microcosmes inoculés avec PT, AT, FT et PY sont respectivement de 72,2 mg/kg, 47,6 mg/kg, 118,7 mg/kg et 51,9 mg/kg contre 156,1 mg/kg dans le témoin. La biodégradation du pyrène à 50 jours par PT, AT, FT et PY a donc atteint respectivement 54%, 69%, 24% et 67% de la teneur du témoin à 50 jours.

L'élévation de température de 23°C à 30°C est donc favorable à la biodégradation du pyrène par les 4 consortia sélectionnés.

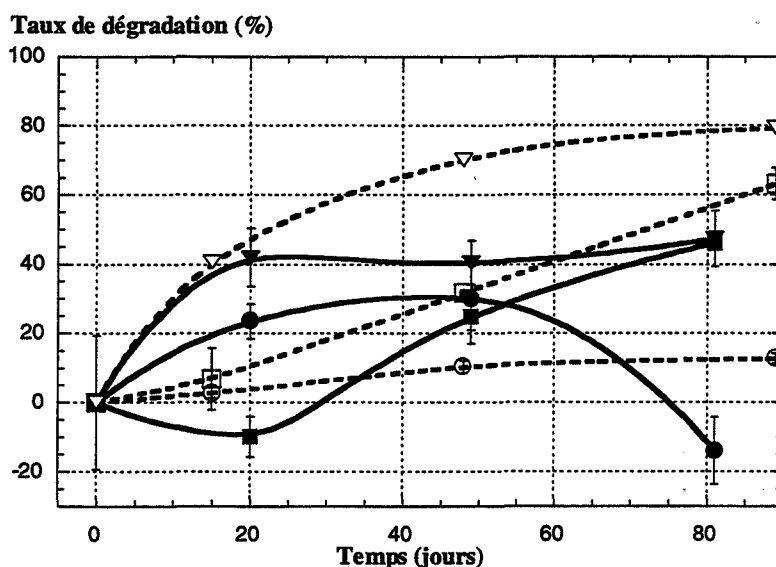


Figure VIII.1.2.3.3-d : Taux de dégradation du pyrène dans les microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia FT et PY.

A 23°C, ● : témoin ; ■ : FT ; ▼ : PY. A 30°C, ○ : témoin ; □ : FT ; ▽ : PY.

Pour le benzo(a)anthracène et le chrysène, l'addition des consortia au sol pollué autoclavé n'induit pas ou très peu de dégradation par rapport au témoin, aux deux températures étudiées, comme le montrent les valeurs reportées dans le Tableau VIII.1.2.3.3-a. Aussi, nous n'avons pas reporté ici les graphes correspondants.

Ainsi, les 4 consortia sélectionnés au V ne sont pas capables d'utiliser tous les HAP à 4 cycles : ils ne sont pas capables de dégrader le benzo(a)anthracène et le chrysène. Ils ont toutefois la capacité de dégrader le fluoranthène et le pyrène contenus dans un sol pollué : jusqu'à 60% (PT et PY à 30°C) après 50 jours pour le fluoranthène et jusqu'à 69% pour le pyrène (AT à 30°C à 50 jours).

La biodégradation due au consortium FT est en général moins élevée que celle des autres consortia. L'élévation de température de 23°C à 30°C améliore les performances de biodégradation des consortia PT, AT et PY sur ces 2 HAP quadricycliques, mais pas celles de FT.

#### VIII.1.2.3.4 - 5 et 6 cycles : benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)-pyrène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

Nous n'avons observé de biodégradation par les 4 consortia étudiés sur aucun des HAP de 5 et 6 cycles. Aussi, nous avons présenté les résultats des inoculations seulement avec les consortia PT et AT, sachant que ceux avec FT et PY sont tout à fait similaires (i.e. il n'y a pas de biodégradation). Nous avons également cette fois représenté les teneurs en HAP de 5 cycles, plutôt que des taux de dégradation sans valeur.

Nous avons enfin représenté les variations des teneurs cumulées en HAP de 5 cycles (Figure VIII.1.2.3.4-a) et en HAP de 6 cycles (Figure VIII.1.2.3.4-b), car elles sont représentatives des phénomènes observés pour les HAP pris individuellement.

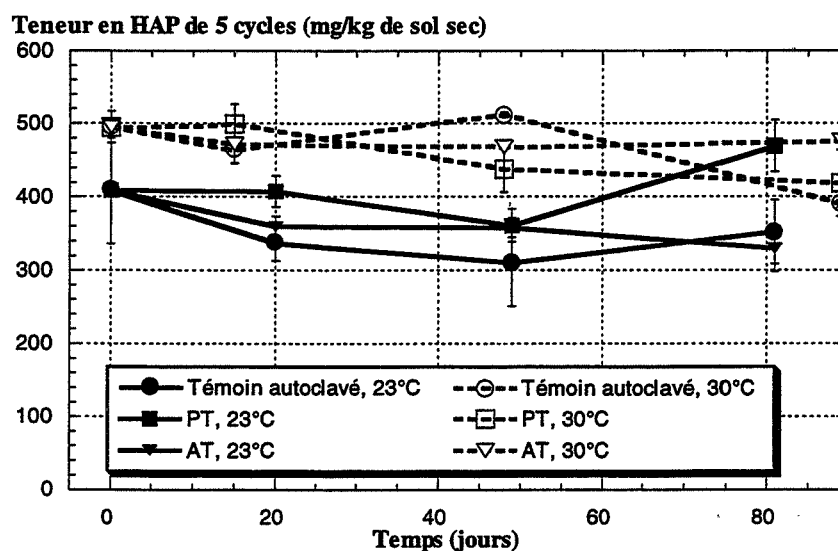


Figure VIII.1.2.3.4-a : Teneur en HAP de 5 cycles des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

Les 4 consortia PT, AT, FT et PY ne sont donc pas capables de dégrader les HAP de 5 et 6 cycles. Nous nous attendions à ce résultat puisque nous avons observé au VIII.1.2.2 qu'ils n'étaient pas capables de dégrader les HAP cancérigènes.

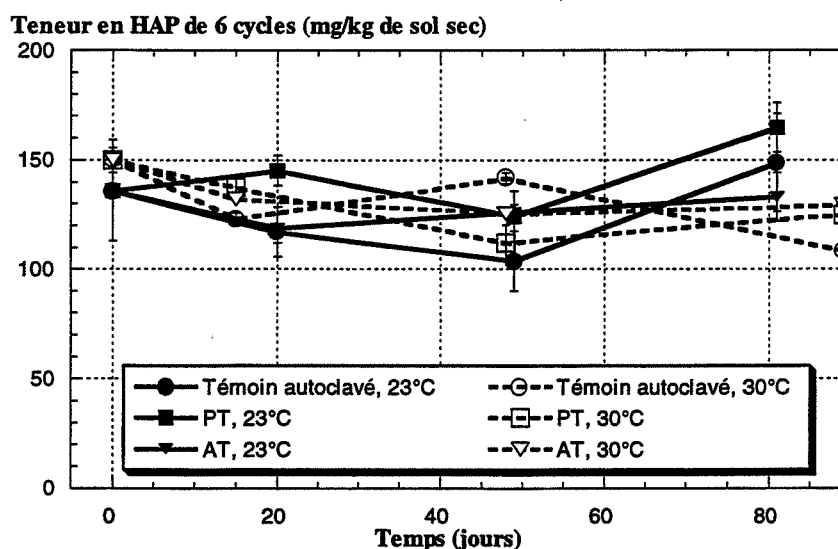


Figure VIII.1.2.3.4-b : Teneur en HAP de 6 cycles des microcosmes de sol inoculés ou non avec les consortia PT et AT.

#### VIII.1.2.3.5 – Calcul des demi-vies

Nous avons reporté (Tableau VIII.1.2.3.5-a), à partir des résultats de dégradation obtenus précédemment, les demi-vies du naphthalène, de l'acénaphthylène, de l'acénaphthène, du fluorène, du phénanthrène, de l'anthracène, du fluoranthène et du pyrène dans les microcosmes de sol pollué autoclavé inoculés avec les consortia PT, AT, FT et PY, dans les témoins autoclavés non inoculés et des microcosmes de sol non stérile (cf. Tableau V.3.4-a) à 23°C et 30°C.

Ces HAP sont ceux biodégradés par les 4 consortia, comme nous venons de le voir. Nous les considérerons donc comme étant les HAP cibles des consortia PT, AT, FT et PY.

Les demi-vies données ici représentent en fait l'ensemble des pertes biotiques et abiotiques des HAP dans les différents microcosmes de sol. C'est pourquoi l'indication des demi-vies dans les témoins à 23°C et à 30°C est importante pour mesurer l'apport de l'inoculation avec les consortia PT, AT, FT et PY. Elles ont été calculées selon la méthode indiquée au V.2.4.

Nous avons également reporté les valeurs des demi-vies que nous avons mesurées au V.3.4 pour la biodégradation naturelle dans le sol à 23°C et 30°C (pH=7,2 et 20% d'humidité comme ici). Nous pourrions ainsi comparer les performances des consortia avec la dégradation naturelle qui a lieu dans le sol pollué.

Ainsi, l'augmentation de température de 23°C à 30°C diminue de manière significative les demi-vies des HAP indiqués au Tableau VIII.1.2.3.5-a pour les consortia PT, AT et PY. Elle accélère donc la disparition globale de ces HAP en augmentant le cumul des pertes biotiques et abiotiques.

Demi-vies (jours)	PT		AT		FT		PY		Témoin		Non stérile	
	23	30	23	30	23	30	23	30	23	30	23	30
Température (°C)	23	30	23	30	23	30	23	30	23	30	23	30
Acénaphthylène	22	5	39	7	20	20	14	7	>80	55	35	18
Acénaphthène	15	10	>80	15	>80	10	>80	10	>80	10	16	10
Fluorène	13	7	13	7	9	37	9	8	71	>90	14	11
Phénanthrène	16	7	18	7	9	38	9	9	74	>90	15	13
Anthracène	16	12	20	9	20	40	20	16	76	>90	23	15
Fluoranthène	40	40	55	40	70	80	67	28	82	>90	40	23
Pyrène	>80	43	>80	17	>80	70	>80	22	>80	>90	57	49

**Tableau VIII.1.2.3.5-a : Calcul des demi-vies (en jours) du naphthalène, de l'acénaphthylène, de l'acénaphthène, du fluorène, du phénanthrène, de l'anthracène, du fluoranthène et du pyrène dans les microcosmes de sol pollué autoclavé inoculés avec les consortia PT, AT, FT et PY, dans les témoins autoclavés non inoculés et des microcosmes de sol non stérile (cf. Tableau V.3.4-a) à 23°C et 30°C.**

A 30°C, pour l'acénaphthène, aucune biodégradation induite par l'inoculation avec les consortia n'apparaît par rapport au témoin : les pertes abiotiques sont prédominantes. Après 10 jours d'incubation, il ne reste déjà dans le témoin que 50% de sa teneur de départ. Les demi-vies indiquées à 30°C pour l'acénaphthène ne sont donc pas significatives d'une biodégradation.

A 23°C, PT est le seul consortium améliorant la biodégradation de l'acénaphthène par rapport au témoin. PT semble le seul consortium ayant une capacité de biodégradation (toute relative) de l'acénaphthène, à 23°C.

Le consortium FT inoculé dans les microcosmes de sol pollué autoclavé a un comportement différent des 3 autres consortia étudiés.

En effet, les demi-vies des différents HAP reportés au Tableau VIII.1.2.3.5-a sont plus élevées à 30°C qu'à 23°C dans les microcosmes inoculés avec FT. Nous avons en effet déjà remarqué que l'augmentation de température étudiée ici ralentit la biodégradation des HAP cibles.

A 23°C, les demi-vies des HAP reportés dans le Tableau VIII.1.2.3.5-a dans les microcosmes inoculés sont **similaires** à celles obtenues dans les microcosmes non stériles. Le pyrène se distingue, la demi-vie n'ayant pu être calculée (>80 jours) dans les microcosmes inoculés, alors qu'elle est de 57 jours dans le microcosme non stérile. A cette température, le pyrène est donc moins bien dégradé par les consortia que par la microflore naturelle.

Par contre, à 30°C, les demi-vies des HAP dans le microcosme inoculé avec FT sont toutes très **supérieures** à celles de la biodégradation naturelle : 37 jours contre 11 pour le fluorène, 80 jours contre 23 pour le fluoranthène par exemple. Ce consortium a donc une température optimale inférieure à 30°C.

A 30°C, les demi-vies de l'acénaphthylène, du fluorène, du phénanthrène et de l'anthracène dans les microcosmes inoculés avec PT, AT et PY sont inférieures à celles de la biodégradation naturelle. Pour l'**acénaphthylène**, elles sont entre **5 et 7** jours contre **18** jours pour la biodégradation naturelle. Pour le **fluorène**, elles sont entre **7 et 8** jours contre **11** jours pour la biodégradation naturelle. Pour le **phénanthrène**, elles sont entre **7 et 9** jours contre **13** jours pour la biodégradation naturelle. Pour l'anthracène, elles sont entre **9 et 16** jours contre **15** jours pour la biodégradation naturelle.

Les demi-vies de la biodégradation naturelle de ces HAP étant déjà assez faibles, ces gains sont significatifs.

A 30°C, pour le **fluoranthène**, seul PY a une demi-vie (**28** jours) proche de celle observée dans la biodégradation naturelle (**23** jours). Celles de **PT et AT** sont toutes deux de **40** jours.

Enfin, à 30°C, pour le **pyrène**, les demi-vies dans les microcosmes inoculés avec PT, AT et PY sont inférieures à celle dans le sol naturel. Elles sont en effet égales à **43** jours, **17** jours et **22** jours pour **PT, AT et PY** respectivement, contre **49** jours pour la biodégradation naturelle.

### VIII.1.3 – Bilan

Nous avons donc testé à 23°C deux quantités d'inoculum différentes pour les 4 consortia PT, AT, FT et PY pour la biodégradation des HAP contenu dans un sol pollué stérilisé. La quantité d'inoculum la plus élevée (4 ml d'absorbance à 600 nm égale à 1,5, pour 120-130 g de sol sec) donnait globalement une biodégradation plus rapide des HAP non cancérigènes, alors qu'aucune biodégradation des HAP cancérigènes ne pouvait être mise en évidence.

Nous avons donc choisi cette quantité d'inoculum pour étudier la biodégradation des HAP par les 4 consortia PT, AT, FT et PY en microcosmes de sol stérile à deux températures d'incubation, 23°C et 30°C.

Ainsi, aucune biodégradation due à l'inoculation avec les 4 consortia (inoculés individuellement) n'a été observée à 23°C et 30°C pour les HAP suivants :

- benzo(a)anthracène et chrysène (4 cycles),
- benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène et dibenzo(a,h)-anthracène (5 cycles),
- benzo(g,h,i)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène (6 cycles).

Ceci est décevant mais non étonnant car les HAP de sélection des consortia PT, AT, FT et PY sont respectivement le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène. Or, ces 4 HAP sont tous plus facilement biodégradables que les 8 énumérés ci-dessus. Notre choix pour la sélection s'est d'ailleurs porté sur ces 4 HAP pour cette raison : nous voulions nous assurer d'obtenir un résultat, ce qui était loin d'être évident si nous avions choisi les

HAP de sélection des consortia parmi les 8 HAP de poids moléculaires les plus élevés. En outre, ces derniers auraient été très coûteux à utiliser.

L'acénaphthène n'est pas non plus biodégradé par les 4 consortia à 23°C et 30°C. Seul PT le dégrade légèrement à 23°C. Nous avons d'ailleurs tenté un essai de sélection d'un consortium sur l'acénaphthène au VI.1.2, qui avait échoué.

A 23°C, dans les microcosmes inoculés avec les consortia, nous avons vu que les demi-vies des HAP (acénaphthylène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène) sont environ égales à celles de la biodégradation naturelle.

Cela est faux pour le pyrène où elles sont supérieures dans les microcosmes stériles inoculés.

A 30°C, pour PT, AT et PY, les demi-vies de ces 6 HAP (cibles) sont plus faibles dans les microcosmes stériles inoculés que dans la biodégradation naturelle.

La biodégradation de ses HAP cibles par FT est plus rapide à 23°C qu'à 30°C. C'est le contraire pour les consortia PT, AT et PY pour lesquels l'augmentation de température de 23°C à 30°C accélère la biodégradation.

Donc, en résumé :

- PT, AT, FT et PY sont capables de dégrader l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène (leurs HAP cibles) dans un sol pollué stérile,
- seul PT semble dégrader légèrement l'acénaphthène, à 23°C mais pas à 30°C,
- à 23°C, les demi-vies des HAP dans les microcosmes inoculés sont presque identiques à celle de la biodégradation naturelle,
- la biodégradation de leurs HAP cibles par les consortia PT, AT et PY est plus rapide à 30°C qu'à 23°C,
- à 30°C, les demi-vies des HAP dans les microcosmes inoculés sont en général inférieures à celle de la biodégradation naturelle, peut-être parce que la sélection des consortia a été réalisée à une température (23°C) supérieure à la température moyenne du sol,
- la biodégradation de ses HAP cibles par le consortium FT est plus rapide à 23°C qu'à 30°C.

## VIII.2 – Inoculation de microcosmes de sol non stérile à 30°C

Nous avons vu précédemment aux V.3 et VIII.1.2 que la biodégradation des HAP en microcosmes de sol pollué est globalement plus rapide à 30°C qu'à 23°C. Nous avons également noté dans les essais en microcosmes stériles au VIII.1.2 que la biodégradation par les consortia PT, AT et PY est plus performante par rapport à la biodégradation naturelle à 30°C qu'à 23°C.

Aussi, nous avons choisi cette température pour inoculer des microcosmes de sol non stérile avec AT et PY. Nous n'avons étudié que 2 consortia pour un problème de quantité d'échantillon.

Nous avons choisi AT et PY car le premier, AT, a été sélectionné sur un HAP de 3 cycles, l'anthracène, alors que le second, PY, a été sélectionné sur un HAP de 4 cycles, le pyrène. Nous avons choisi AT par rapport à PT car sa biodégradation du pyrène est meilleure que celle de PT (demi-vie plus faible, cf. Tableau VIII.1.2.3.5-a). Enfin, PY a de meilleures performances que FT pour la biodégradation : l'activité de FT est plus faible à 30°C qu'à

23°C et les demi-vies de PY sont plus faibles que celles de FT pour les HAP biodégradés (cf. Tableau VIII.1.2.3.5-a).

Nous avons vu au VIII.1 que ces consortia sont capables de dégrader des HAP dans un sol pollué stérile. Cela nous a permis de déterminer les capacités de dégradation propres à ces consortia (vitesse, HAP cibles). Pour les HAP cibles de ces consortia, nous avons vu que la biodégradation est comparable à la biodégradation naturelle.

Nous avons procédé à la sélection des consortia dans le but d'inoculer le sol pollué et d'améliorer la vitesse et/ou l'étendue de la dégradation des HAP.

Or, un sol naturel n'est pas stérile. Il est donc primordial de connaître le comportement de ces consortia dans un environnement pollué non stérile (naturel), plus complexe donc qu'au VIII.1, et de mesurer l'apport que l'inoculation de tels mélanges microbiens dans un sol naturel peut avoir.

Nous représenterons donc dans la suite 3 conditions (cf. IV.5) différentes :

- la biodégradation naturelle (Non autoclavé),
- l'inoculation avec AT (Non autoclavé + AT),
- l'inoculation avec PY (Non autoclavé + PY).

Nous avons travaillé à 30°C, 20% d'humidité, pH=7,2, la densité des inocula étant identique à celle du VIII.1.2.

Nous représenterons les teneurs des microcosmes en mg/kg de sol sec car les 3 conditions étudiées appartiennent à la même série d'expériences. Les teneurs initiales sont donc identiques. Elles sont identiques à celles données à 30°C dans le Tableau V.3-a. Remarquons qu'elles sont supérieures à celles des microcosmes autoclavés précédemment étudiés : ceci est dû à la chaleur de l'autoclavage qui implique des pertes en HAP de 2 et 3 cycles essentiellement. Nous n'avons pas représenté de témoin autoclavé car nous nous intéressons à l'apport des inocula par rapport à la dégradation naturelle et les pertes abiotiques sont identiques dans les 3 conditions qui seront représentées ici.

### VIII.2.1 – Dénombrements sur géloses

Comme précédemment au VIII.1, nous avons procédé aux dénombrements sur gélose NB (Figure VIII.2.1-a) de la population microbienne des microcosmes de sol. En outre, comme il n'y a pas eu autoclavage ici, nous avons également procédé aux dénombrements sur gélose ME (Figure VIII.2.1-b). Le dénombrement initial a à nouveau été réalisé à 1 jour d'incubation.

Au VIII.1.2, l'inoculation avec AT et PY nous a donné des dénombrements initiaux de  $490 \cdot 10^6$  et  $320 \cdot 10^6$  UFC/g respectivement, alors que les dénombrements initiaux sont ici de  $90 \cdot 10^6$  et  $110 \cdot 10^6$  UFC/g pour respectivement AT et PY et  $90 \cdot 10^6$  UFC/g pour le microcosme non inoculé.

Nous aurions donc logiquement dû obtenir des dénombrements bien plus élevés dans les 2 microcosmes inoculés avec AT et PY par rapport au microcosme non inoculé. Or, cela n'est pas le cas : il y a peut-être existence d'interactions entre les micro-organismes constituant les consortia AT et PY et la microflore indigène qui empêche leur extraction par NaCl 0,9% lors de la préparation pour le comptage.



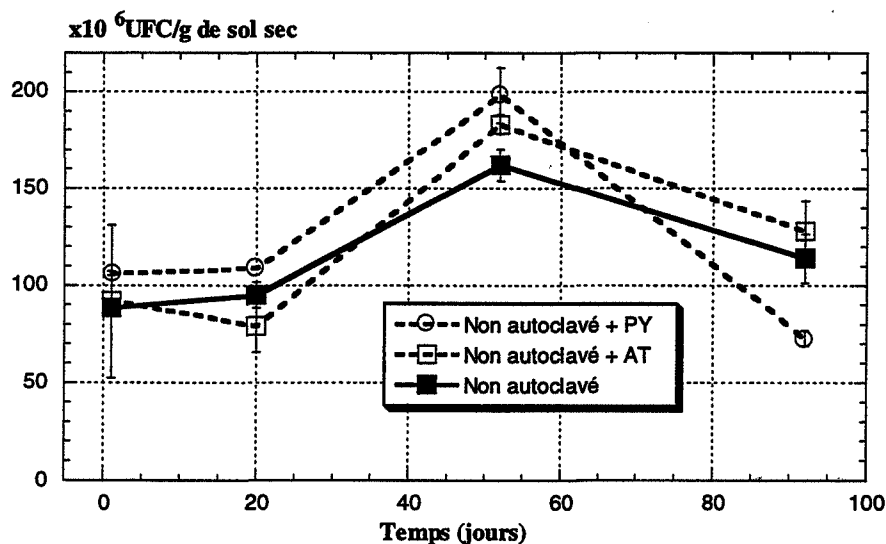


Figure VIII.2.1-a : Dénombrement sur milieu NB (pH=7,2) de la population microbienne (bactéries et Actinomycètes) des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Les dénombrements moyens sur NB sont globalement légèrement plus élevés dans les microcosmes inoculés avec AT et PY, ceci étant particulièrement vrai à 50 jours d'incubation. Mais si nous tenons compte des écarts-types, les dénombrements peuvent être considérés comme tout à fait similaires (Figure VIII.2.1-a).

En ce qui concerne les dénombrements sur les géloses ME (levures et champignons), ils sont du même ordre dans les 3 conditions. Ils diminuent en permanence au cours de l'incubation (Figure VIII.2.1-b).

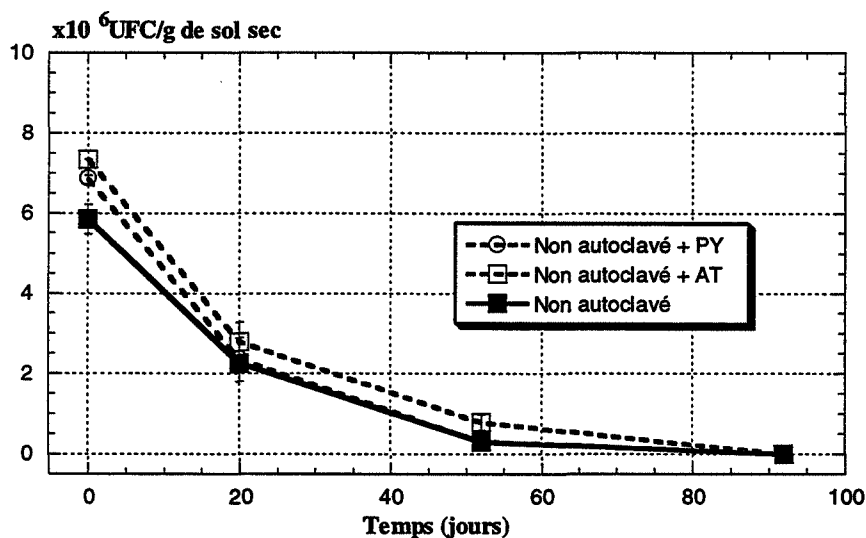


Figure VIII.2.1-b : Dénombrement sur milieu ME (pH=4,5) de la population microbienne (levures et champignons) des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Donc, sur gélose NB, la population de bactéries et Actinomycètes augmente jusqu'à 50 jours d'incubation comme à la Figure V.2.1-a à 23°C. Sur gélose ME, il y a diminution permanente de la population de levures et champignons jusqu'à 95 jours d'incubation.

Nous nous attendons donc à observer la biodégradation plutôt entre 0 et 50 jours d'incubation.

### VIII.2.2 – Dégénération globale des HAP non cancérogènes et cancérogènes

En ce qui concerne les HAP non cancérogènes, l'addition de AT n'accélère pas la biodégradation par rapport à la biodégradation naturelle. Par contre, l'addition de PY accélère la biodégradation. La teneur finale en HAP non cancérogènes est dans les 3 conditions d'environ 500 mg/kg, qui semble être une valeur d'équilibre (Figure VIII.2.2-a).

Mais cette teneur est atteinte vers 20 jours d'incubation en présence de PY contre 50 jours en présence de AT ou sans inoculation. Il y a donc un gain de 30 jours environ pour atteindre la teneur finale.

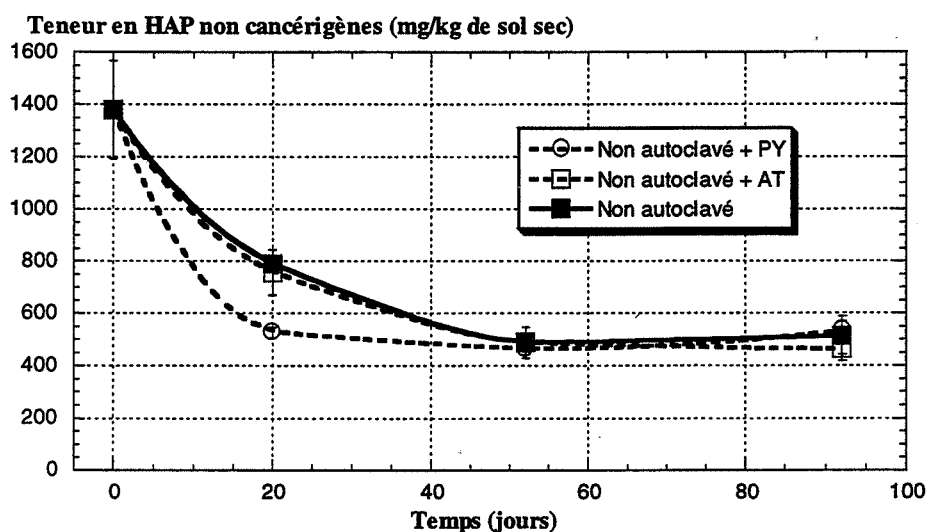


Figure VIII.2.2-a : Teneurs en HAP non cancérogènes des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Pour les HAP cancérogènes, les teneurs sont identiques dans les 3 conditions à 50 jours. Toutefois, il existe des différences à 20 jours d'incubation.

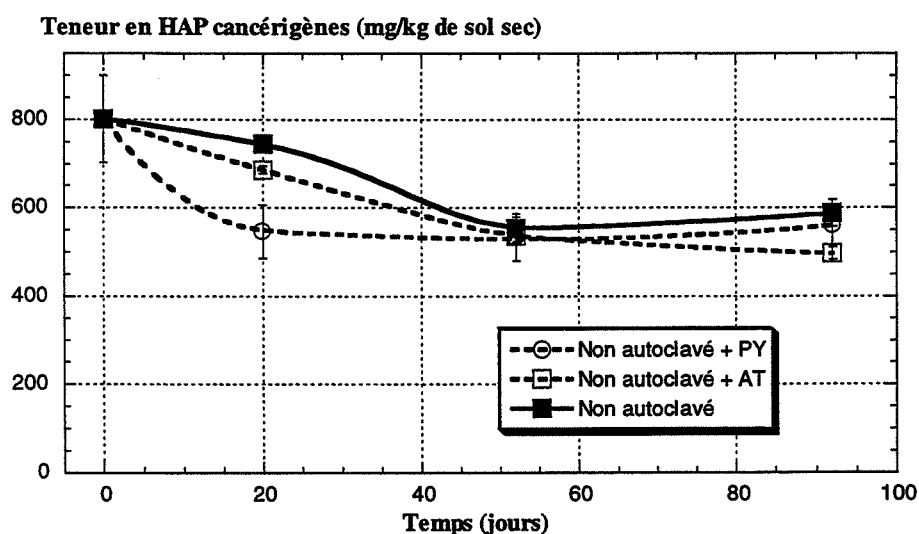


Figure VIII.2.2-b : Teneurs en HAP cancérogènes des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

La diminution de la teneur en HAP cancérigènes est plus rapide en présence de PY qu'en présence de AT, elle-même légèrement plus rapide que la biodégradation naturelle (Figure VIII.2.2-b). Pour les teneurs à 95 jours, nous pouvons considérer qu'elles sont égales dans les 3 conditions en tenant compte des écarts-types. L'équilibre semble donc être atteint à nouveau ici à 20 jours en présence de PY, contre 50 jours dans la biodégradation naturelle additionnée ou non de AT.

Les effets de AT et PY inoculés dans le sol pollué non stérile sont donc différents. PY, qui a été sélectionné sur un HAP plus gros (4 cycles) que AT (3 cycles), semble plus performant et accélère la biodégradation des HAP cancérigènes ou non. Il ne semble toutefois pas avoir d'influence sur l'équilibre atteint dans le sol.

### VIII.2.3 – Biodégradation par famille de HAP

Comme nous l'avons fait aux V et VIII.1, nous allons étudier l'influence de l'addition de AT et PY sur la dégradation des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. de manière plus détaillée.

#### VIII.2.3.1 – Naphtalène, acénaphtylène, acénaphène

La dégradation du naphtalène (Figure VIII.2.3.1-a) est légèrement plus rapide en présence de PY. La teneur minimale est d'environ 15 mg/kg (écarts-types pris en compte) dans les 3 conditions étudiées, soit environ 50% de dégradation.

Cette valeur est atteinte après 20 jours d'incubation pour PY, contre 50 jours pour les autres conditions.

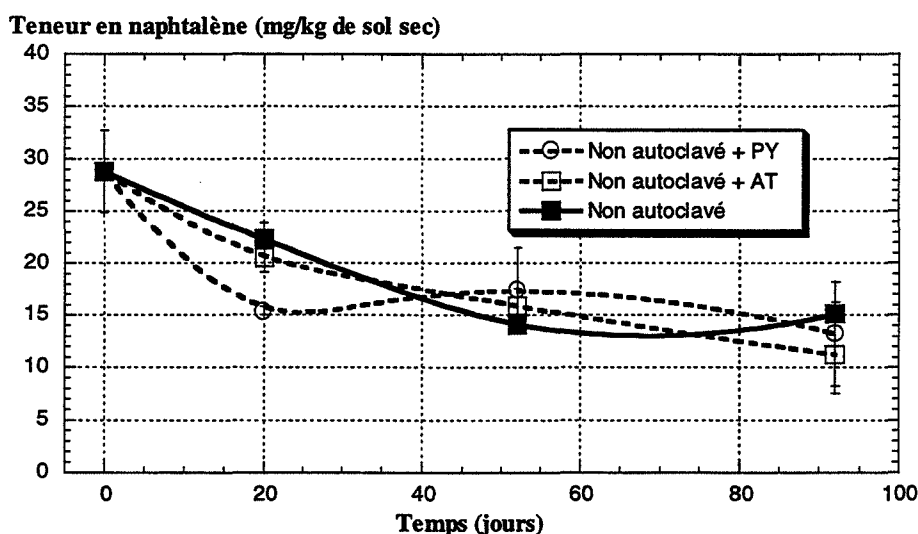


Figure VIII.2.3.1-a : Teneurs en naphtalène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Pour l'acénaphtylène (Figure VIII.2.3.1-b), la diminution de sa teneur est plus rapide en présence de PY, alors qu'en présence de AT elle est identique à la dégradation naturelle. La teneur finale en acénaphtylène est d'environ 5 mg/kg dans les 3 cas, soit 85% de dégradation environ.

Pour l'acénaphène (Figure VIII.2.3.1-c), en tenant compte des écarts-types, l'addition des consortia AT et PY n'améliore pas la biodégradation par rapport à la biodégradation naturelle. Nous nous attendions à ce résultat au vu de ce que nous avons obtenu au VIII.1.2

pour l'acénaphène : aucune biodégradation de l'acénaphène n'avait été mise en évidence à 30°C pour les consortia AT et PY.

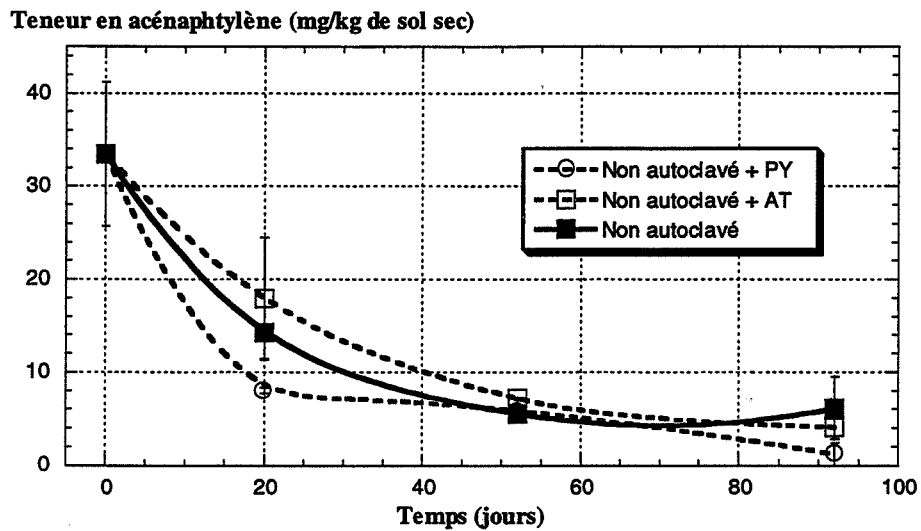


Figure VIII.2.3.1-b : Teneurs en acénaphylène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

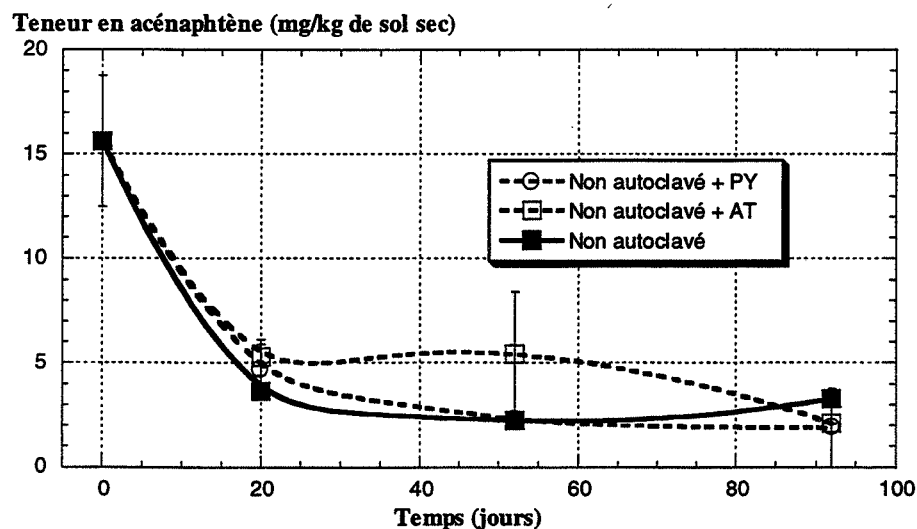


Figure VIII.2.3.1-c : Teneurs en acénaphène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

### VIII.2.3.2 – 3 cycles : fluorène, phénanthrène, anthracène

La diminution de la teneur en fluorène dans les microcosmes de sol est légèrement meilleure en présence de PY : l'équilibre est atteint à 27 jours contre 50 jours dans la biodégradation naturelle et en présence de AT.

La teneur finale est de 15 mg/kg en fluorène, la biodégradation est donc de 86% à l'équilibre.

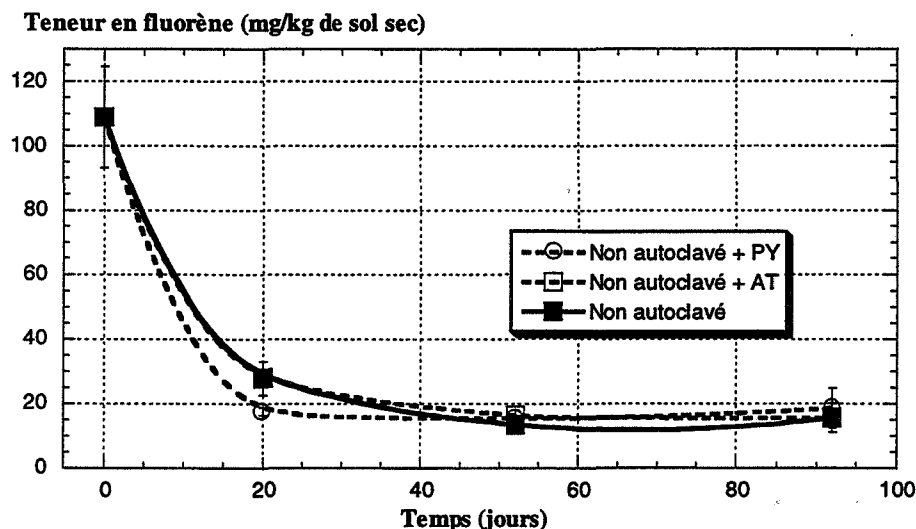


Figure VIII.2.3.2-a : Teneurs en fluorène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

L'apport de l'inoculation avec AT et PY à la dégradation du phénanthrène (Figure VIII.2.3.2-b) est similaire à celui du fluorène. La teneur finale en phénanthrène est d'environ 45 mg/kg dans les 3 conditions étudiées, cette teneur étant atteinte en 30 jours en présence de PY contre 50 jours sinon. Cela correspond à une dégradation globale du phénanthrène de 84%.

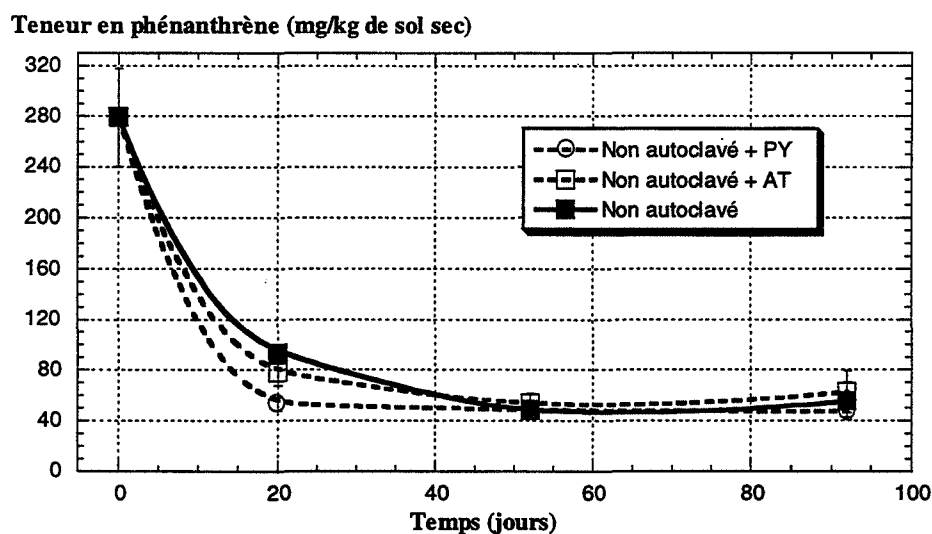


Figure VIII.2.3.2-b : Teneurs en phénanthrène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Pour l'anthracène (Figure VIII.2.3.2-c), les observations sont similaires à celles faites pour le fluorène et l'anthracène.

La teneur finale en anthracène est d'environ 30 mg/kg dans les 3 cas, ce qui représente une dégradation de 80% par rapport à la teneur initiale en anthracène des microcosmes de sol. Cette teneur est atteinte à 30 jours en présence de PY, contre 50 jours sinon.

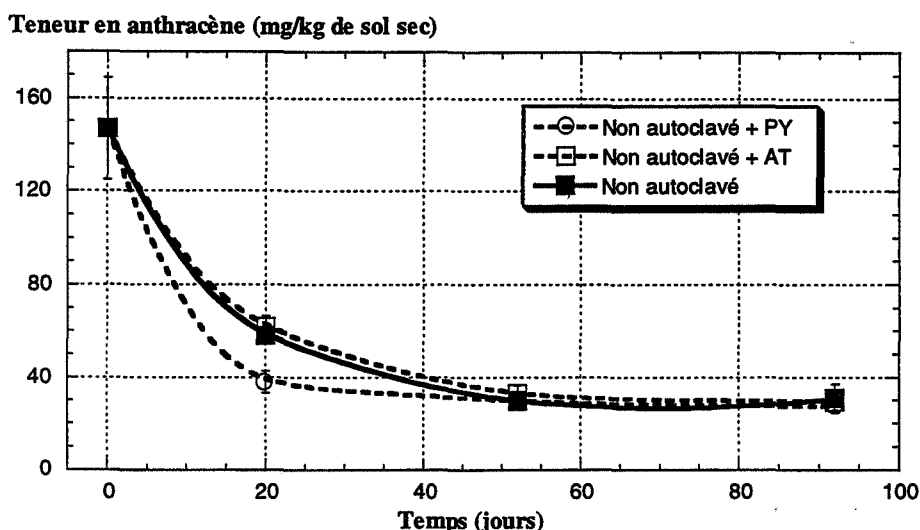


Figure VIII.2.3.2-c : Teneurs en **anthracène** des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

#### VIII.2.3.3 – 4 cycles : fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène

Pour le fluoranthène (Figure VIII.2.3.3-a), l'addition de AT ne modifie pas suffisamment l'évolution de sa teneur dans le microcosme de sol pour le différencier du microcosme non inoculé. Par contre, l'addition de PY accélère à nouveau la disparition de ce HAP.

La teneur finale en fluoranthène est d'environ 140 mg/kg dans les 3 cas, ce qui représente 67% de dégradation par rapport à la teneur initiale. Cette teneur est atteinte en 30 jours en présence de PY, contre 50 jours sinon.

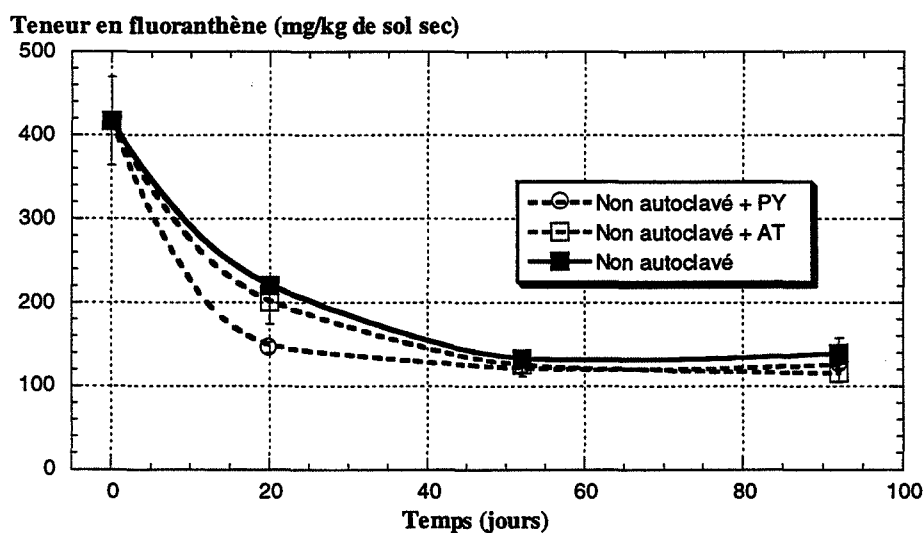


Figure VIII.2.3.3-a : Teneurs en **fluoranthène** des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Pour le pyrène (Figure VIII.2.3.3-b), les différences d'évolution des teneurs des 3 microcosmes étudiés sont plus marquées.

Ainsi, la teneur en pyrène à 95 jours est abaissée dans les microcosmes inoculés : elle y est de 70 mg/kg contre 90 mg/kg dans le microcosme non inoculé. Cette différence est significative si nous considérons les écarts-types sur la Figure VIII.2.3.3-b. Cela correspond à une dégradation de 50% sans inoculation et de 61% en présence de AT ou PY.

Nous voyons également sur cette même figure que la disparition du pyrène est plus rapide en présence de PY que AT. Dans les deux cas, elle est accélérée par rapport au microcosme non inoculé.

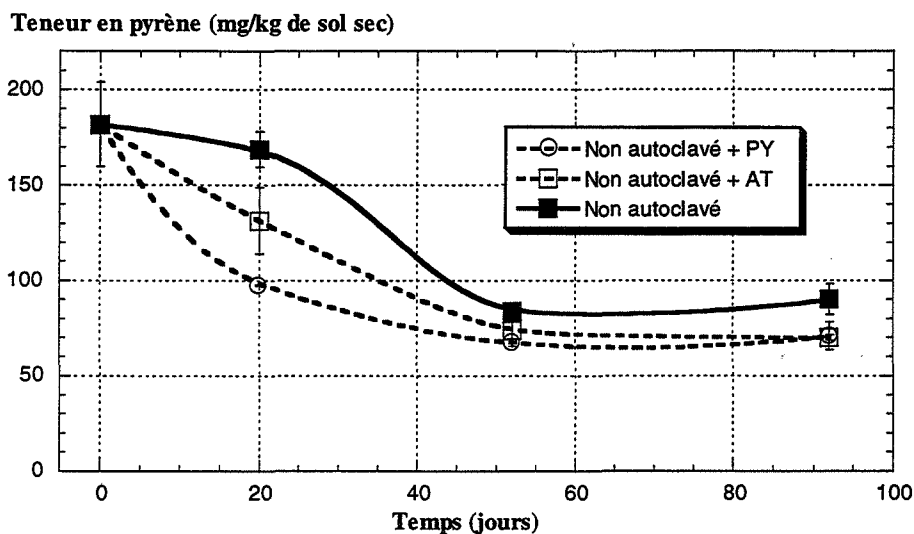


Figure VIII.2.3.3-b : Teneurs en pyrène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Pour le benzo(a)anthracène (Figure VIII.2.3.3-c), le même phénomène que pour le pyrène est observé. La teneur finale dans les microcosmes inoculés avec AT et PY est de 70 mg/kg contre environ 80-90 mg/kg en leur absence. Etant donné les écarts-types, nous considérerons que les teneurs finales sont identiques dans les 3 cas. La dégradation finale est donc de l'ordre de 53%. Elle est plus rapide au début en présence de PY. Nous n'avons pas observé de dégradation du benzo(a)anthracène en microcosme stérile par AT et PY.

La mesure à 20 jours concernant l'addition de AT ne permet pas d'affirmer que AT accélère la biodégradation, à cause de l'écart-type mesuré.

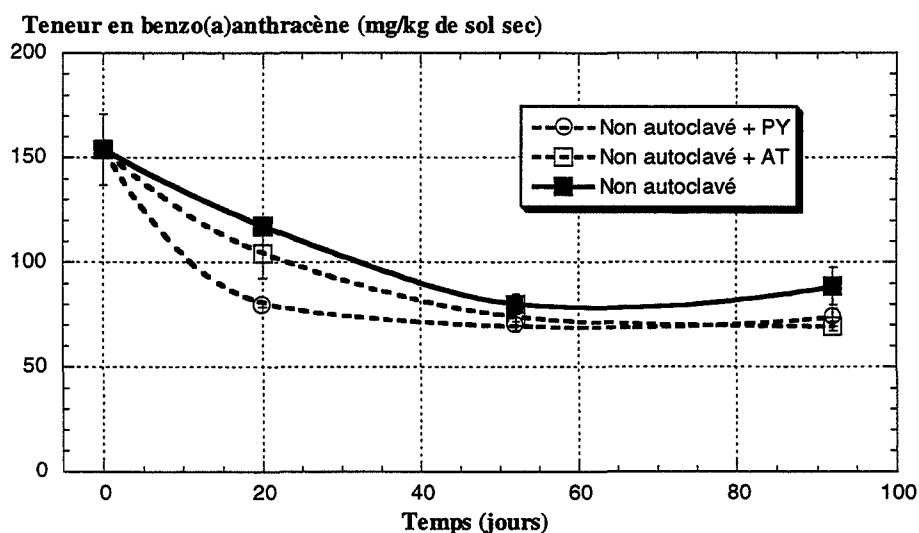


Figure VIII.2.3.3-c : Teneurs en benzo(a)anthracène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

Pour le chrysène, la teneur finale dans les 3 microcosmes est d'environ 80 mg/kg, ce qui représente 50% de dégradation par rapport à la teneur initiale en chrysène (Figure VIII.2.3.3-d).

L'addition de AT n'accélère pas réellement la biodégradation par rapport à la dégradation naturelle. Par contre, l'addition de PY a un effet accélérateur, l'équilibre semblant atteint à environ 30 jours au lieu de 60 jours environ. Toutefois, la biodégradation n'est pas augmentée en termes de teneur en chrysène, comme précédemment pour la plupart des HAP étudiés.

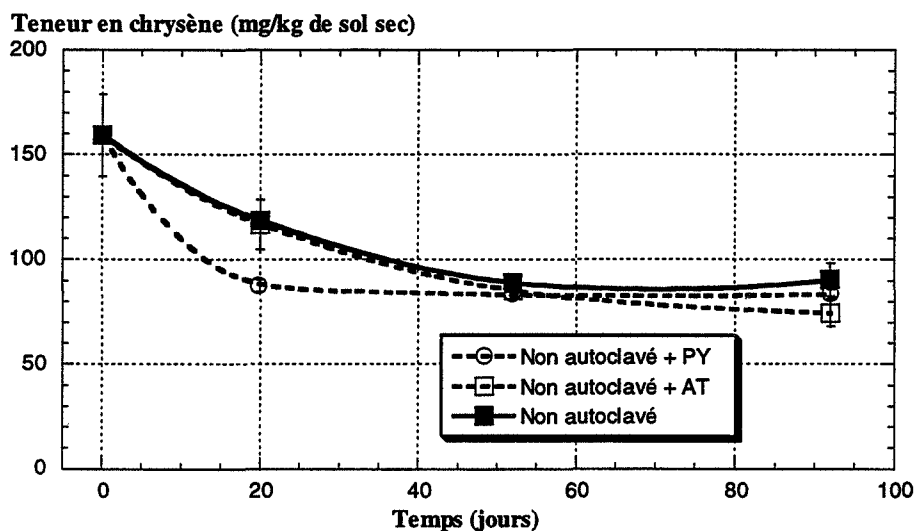


Figure VIII.2.3.3-d : Teneurs en chrysène des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

VIII.2.3.4 – 5 et 6 cycles : benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)-pyrène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène

Nous avons représenté les HAP de 5 cycles sur un même graphe à la Figure VIII.2.3.4-a car, pour les 4 HAP concernés, les courbes obtenues étaient toutes similaires en termes de taux de dégradation. Nous avons donc fait le cumul des teneurs. En outre, la biodégradation finale est très faible, de l'ordre de 20% par rapport à la teneur initiale.

La courbe représentant l'effet de AT est confondue avec celle de la biodégradation naturelle jusqu'à 50 jours d'incubation. A 95 jours, l'écart-type est tel que le point correspondant peut être assimilé à la biodégradation naturelle. L'addition de AT n'a donc pas d'effet sur la biodégradation des HAP de 5 cycles.

Par contre, à 20 jours d'incubation, l'addition de PY permet d'atteindre 400 mg/kg en HAP de 5 cycles, ce qui correspond à la teneur finale dans le microcosme non inoculé. L'addition de PY semble donc accélérer la biodégradation des HAP de 5 cycles (tous dans la même proportion, d'après nos mesures). Mais, à 95 jours, la teneur est à nouveau de 500 mg/kg : il est donc difficile de conclure sur l'effet de l'addition de PY pour la biodégradation des HAP de 5 cycles. En outre, nous n'avons pas trouvé de biodégradation des HAP de 5 cycles par PY dans les essais en microcosmes stériles à 30°C au VIII.1.2.

Pour les HAP de 6 cycles (au nombre de 2), nous avons également cumulé les teneurs à la Figure VIII.2.3.4-b pour les mêmes raisons que pour les HAP de 5 cycles.

En tenant compte des écarts-types, la biodégradation finale est de l'ordre de 10% dans les 3 conditions étudiées. PY et AT semblent accélérer légèrement la biodégradation, mais le phénomène de dégradation reste faible.



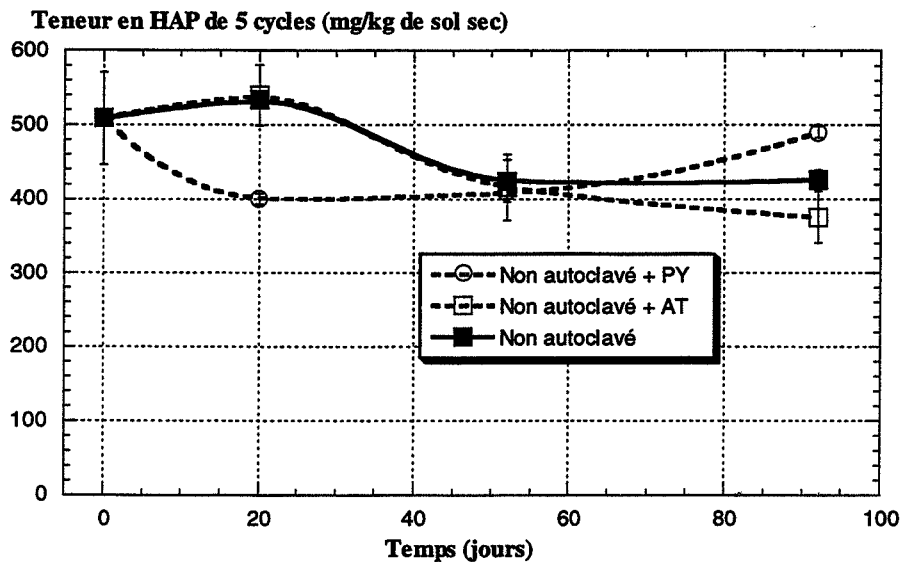


Figure VIII.2.3.4-a : Teneurs en HAP de 5 cycles des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

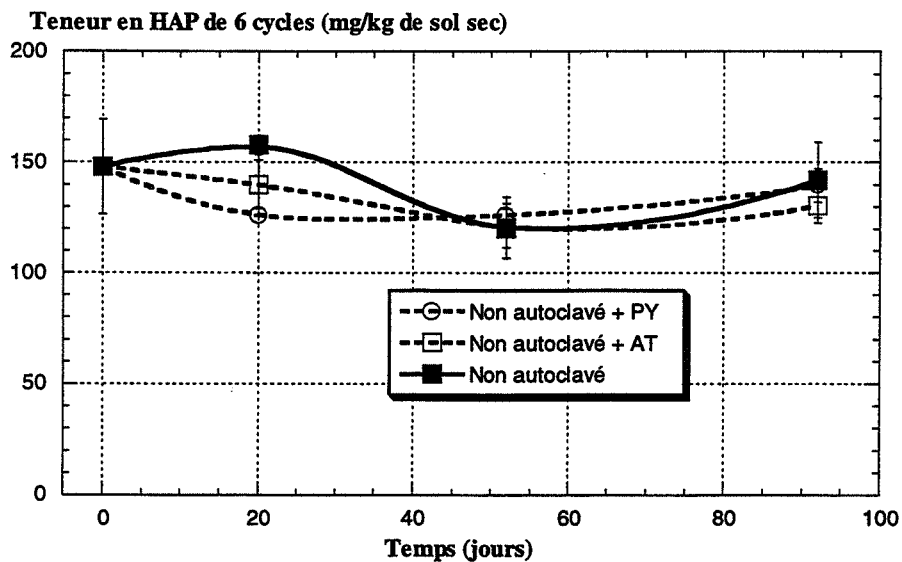


Figure VIII.2.3.4-b : Teneurs en HAP de 6 cycles des microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec les consortia AT et PY à 30°C.

#### VIII.2.3.5 – Calcul des demi-vies

Afin de mieux visualiser l'influence de l'addition des consortia AT et PY sur la biodégradation des HAP en microcosmes de sol non stérile, nous avons calculé les demi-vies des HAP concernés. Nous n'avons pas considéré les HAP de 5 et 6 cycles car leur dégradation est très faible, entre 10 et 20% de la teneur initiale. Les résultats sont indiqués dans le Tableau VIII.2.3.5-a.

Ainsi, l'inoculation du sol pollué avec AT permet d'abaisser les demi-vies des HAP de 4 cycles, ainsi que du phénanthrène (faiblement toutefois) par rapport au microcosme non inoculé.

		Non autoclavé non inoculé	Non autoclavé + AT	Non autoclavé + PY
<b>2 cycles</b>	<b>Naphtalène</b>	50	50	20
<b>3 cycles</b>	<b>Acénaphthylène</b>	18	22	10
	<b>Acénaphène</b>	10	10	10
	<b>Fluorène</b>	11	11	7
	<b>Phénanthrène</b>	13	10	8
	<b>Anthracène</b>	15	15	10
<b>4 cycles</b>	<b>Fluoranthène</b>	23	19	12
	<b>Pyrène</b>	49	41	27
	<b>Benzo(a)anthracène</b>	60	50	30
	<b>Chrysène</b>	> 95	64	50

**Tableau VIII.2.3.5-a** : Calcul des demi-vies des HAP de 2 à 4 cycles dans les microcosmes de sol non stérile inoculés ou non avec AT et PY, à 30°C.

L'inoculation avec PY a un effet plus marqué. Il agit en effet sur les demi-vies de tous les HAP de 2 à 4 cycles, sauf l'acénaphène. Les demi-vies des HAP sur lesquelles un effet apparaît sont davantage abaissées que pour AT.

Les effets des consortia AT et PY, quand ils existent, sur la biodégradation des HAP correspondent à une accélération de la diminution de la teneur dans le sol. Ainsi, les teneurs finales ne sont pas diminuées, sauf peut-être pour le pyrène.

Il semble donc qu'un équilibre propre au sol est atteint, qui n'est pas déplacé par l'addition des consortia. Ces derniers contribuent seulement à l'atteindre plus rapidement, ce qui est déjà positif.

#### VIII.2.4 - Bilan

L'inoculation à 30°C des microcosmes de sol pollué non stérile avec les consortia AT ou PY à la concentration définie au VIII.1.2 modifie la biodégradation des HAP dans le sol.

Nous avons vu au VIII.2.2 que l'addition de PY accélère la biodégradation des HAP non cancérigènes et cancérigènes, celle de AT ayant un léger effet sur les HAP cancérigènes seulement. Les teneurs finales ne sont pas modifiées, i.e. l'équilibre du sol n'est pas affecté.

Ni l'addition de AT, ni celle de PY n'ont d'influence sur la biodégradation de l'acénaphène dans les microcosmes, comme nous nous y attendions au vu des résultats du VIII.1.2.

L'addition de AT n'a d'effet que sur les HAP de 4 cycles (accélération de la biodégradation), de manière plus faible que l'addition de PY.

L'addition de PY accélère nettement la biodégradation des HAP de 3 cycles (sauf l'acénaphène) et de 4 cycles. Elle a également un effet sur les HAP de 5 et 6 cycles, qui atteignent un peu plus rapidement l'équilibre. Peut-être agit-il par cométabolisme sur les HAP de 5 et 6 cycles.

Ainsi, l'effet de l'addition des inocula des consortia AT et PY dans les microcosmes de sol pollué non stérile n'est pas masqué totalement par la présence d'une microflore indigène active. L'inoculation avec AT et PY agit comme un accélérateur de la biodégradation des HAP cibles des consortia.

Ceci est surtout vrai pour PY, pour lequel les demi-vies des HAP cibles, mais encore celles du benzo(a)anthracène et du chrysène, sont environ réduites de moitié par rapport à la biodégradation dans le microcosme pollué non stérile non inoculé.

Toutefois, les teneurs finales des HAP dans les microcosmes ne sont pas modifiées par l'inoculation avec les consortia, comme si un équilibre était atteint en fin d'incubation, équilibre non modifié par l'inoculation. Seule la teneur en pyrène des microcosmes inoculés avec PY ou AT était inférieure à celle du microcosme non inoculé (biodégradation naturelle).

Ce phénomène a déjà été observé par Grosser et al. (1995) lors de l'inoculation de microcosmes de sols avec une *Mycobacterium* sp. capable de dégrader le phénanthrène, l'anthracène et le pyrène.

Ils ont en effet observé que l'inoculation de sol dont la population microbienne indigène montre une forte capacité de dégradation envers ces 3 HAP n'améliore pas notablement leurs taux de dégradation.

Par contre, l'inoculation de sols dans lesquels la population microbienne présente une faible capacité de dégradation de ces HAP améliore très nettement la biodégradation.

Or nous avons travaillé avec un sol dans lequel les taux de dégradation des HAP de 3 et 4 cycles étaient déjà élevés. Cela peut donc expliquer pourquoi l'amélioration due à l'inoculation n'est pas très importante.

Il serait donc certainement judicieux de réaliser l'inoculation de sols pollués dans lesquels la biodégradation naturelle des HAP est plus faible. Il serait alors envisageable, si la biodégradation est augmentée, d'utiliser les micro-organismes que nous avons sélectionnés pour la biorémediation de tels sols.

**CONCLUSION  
GENERALE  
ET  
PERSPECTIVES**



Dans le travail qui précède, nous avons mis en évidence la biodégradation naturelle de HAP de 3 et 4 cycles dans un sol pollué par des HAP, issu d'un site d'ancienne usine à gaz. Ces HAP sont l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(a)anthracène et le chrysène.

Les HAP de 5 et 6 cycles sont peu ou pas biodégradés.

L'addition de sciure dans le sol améliore la cinétique de dégradation des HAP par l'augmentation des échanges gazeux en diminuant le compactage du sol, mais pas par l'apport de micro-organismes exogènes issus de la sciure.

Les niveaux de la population microbienne du sol ne semblent pas directement corrélés à la biodégradation. Une population microbienne élevée n'implique pas une biodégradation élevée des HAP, mais l'absence de population active implique l'absence de biodégradation.

Les processus de dégradation des HAP dans le sol sont plus rapides à 20% d'humidité du sol qu'à 27% car il y a plus d'oxygène gazeux disponible dans le sol à 20% d'humidité, ce qui favorise la dégradation aérobie.

Sans sciure, la dégradation des HAP est plus rapide à pH=7,2 qu'à pH=5,3, et à 30°C plus qu'à 23°C. Il s'agit sans doute d'une dégradation bactérienne.

Pour les HAP cancérigènes, la condition de dégradation la plus favorable correspond à pH=5,3 avec addition de sciure, alors que c'est pH=7,2 avec addition de sciure pour les HAP non cancérigènes.

Les dégradations des HAP cancérigènes et non-cancérigènes doivent donc suivre des voies de dégradation différentes.

Les modifications des conditions d'humidité, d'acidité, de température et d'aération du sol pollué ont donc modifié la cinétique de dégradation des HAP.

Toutefois, elles n'ont pas permis de déplacer l'équilibre final en HAP du sol : quelles que soient les conditions environnementales étudiées ici, les teneurs finales des 16 HAP cibles de l'U.S. E.P.A. sont similaires.

Des consortia de micro-organismes capables d'utiliser des HAP de 3 et 4 cycles comme seule source de carbone ont été sélectionnés.

Quatre d'entre eux ont été davantage étudiés car ils ont présenté une plus grande versatilité de dégradation de plusieurs HAP comme sources carbonées.

Il s'agit de PT, AT, FT et PY sélectionnés respectivement sur le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène.

Nous avons procédé à l'identification des micro-organismes impliqués dans la composition de ces consortia. Les micro-organismes ainsi mis en évidence sont tous des bactéries. Les bactéries dégradant les HAP décrites dans la littérature appartiennent fréquemment aux genres et espèces identifiés ici. Aucun élément pathogène n'ayant été identifié, l'utilisation de ces consortia pour décontaminer des sols ne pose pas de problème de sécurité particulier.

En étudiant la croissance en batch de ces consortia sur différents HAP de 3 et 4 cycles (phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène), nous avons mis en évidence des problèmes de transfert des HAP limitant la croissance bactérienne.

Nous avons également étudié l'effet de l'addition d'un surfactant d'origine bactérienne, le Tween 80, sur la croissance des consortia et des effets contradictoires ont été mis en évidence. L'addition de surfactant pour améliorer la disponibilité des HAP pour les micro-organismes est à utiliser avec des précautions.

Ces consortia dégradent les 4 HAP cités ci-dessus, mais la dégradation n'est pas totale (il ne s'agit pas d'une minéralisation à 100%).

En effet, des métabolites de la dégradation des HAP étudiés ont été mis en évidence dans les surnageants des cultures.

Il faut donc s'attendre à ce que la dégradation des HAP par les consortia sélectionnés, dans un sol pollué inoculé avec ceux-ci, ne soit pas complète.

Nous avons ensuite inoculé des microcosmes de sol pollué avec les consortia PT, AT, FT et PY.

Nous avons d'abord travaillé sur des échantillons de sol stérilisé par autoclavage afin de déterminer les capacités intrinsèques de dégradation des consortia, puis sur du sol non stérile.

Dans du sol pollué stérile, les 4 consortia dégradent l'acénaphthylène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène.

La biodégradation est plus rapide à 30°C qu'à 23°C pour PT, AT et PY. Pour FT, elle est plus rapide à 23°C.

Nous avons inoculé du sol pollué non stérile avec les consortia AT et PY.

AT accélère la dégradation des HAP de 4 cycles uniquement, alors que PY accélère celle des HAP de 3 et 4 cycles, mais aussi celle des HAP de 5 et 6 cycles. Il agit probablement là par cométabolisme.

L'inoculation avec AT et PY agit comme un accélérateur de la biodégradation des HAP cibles des consortia. Ceci est surtout vrai pour PY, pour lequel les demi-vies des HAP cibles, mais encore celles du benzo(a)anthracène et du chrysène, sont environ réduites de moitié par rapport à la biodégradation dans le microcosme pollué non stérile non inoculé.

Toutefois, les teneurs finales des HAP dans les microcosmes ne sont pas notablement modifiées par l'inoculation avec les consortia.

Nous avons travaillé avec un sol dans lequel les taux de dégradation naturelle des HAP de 3 et 4 cycles étaient déjà élevés, ce qui peut expliquer pourquoi l'amélioration due à l'inoculation n'est pas très importante.

Ainsi, les résultats que nous avons obtenus offrent des perspectives intéressantes, tout en posant un certain nombre de questions.

Nous allons reprendre les points soulevés dans l'ordre de présentation du rapport.

Nous avons étudié quelques paramètres environnementaux pour la biodégradation naturelle des HAP en microcosmes de sol. Nous n'avons pas été en mesure de les faire beaucoup varier. Leur optimisation pourrait être une perspective d'étude à elle seule.

Nous avons mis au point une méthode de sélection de micro-organismes (bactéries) capables de dégrader le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène.

Il serait sans doute intéressant, comme ce protocole de sélection est maintenant défini, de sélectionner des micro-organismes sur des HAP plus gros que le benzo(a)anthracène, voire de 5 ou 6 cycles. En effet, la dégradation de ces HAP est très faible, voire inexistante, dans le sol. Si des micro-organismes capables de les dégrader sont inoculés dans le sol, il y a alors de fortes chances pour réussir à augmenter leur taux de dégradation.

Toutefois, peu de micro-organismes capables d'utiliser des HAP plus gros que le benzo(a)anthracène ont été mis en évidence dans la littérature. Une piste possible est la sélection de micro-organismes capables de cométaboliser ces HAP plus gros, en ajoutant, dans le milieu de culture, simultanément aux gros HAP, d'autres sources carbonées, comme de l'extrait de levure ou des HAP de plus faible poids moléculaire.

Nous avons constaté que des métabolites de la dégradation des HAP étudiés sont relargués dans les surnageants des cultures. Or nous n'avons pas réussi à les identifier, ni à évaluer leur toxicité.

Il serait intéressant d'approfondir ce point-là afin de connaître les produits de dégradation ainsi fabriqués. Cela permettrait d'évaluer si les consortia sélectionnés sont intéressants du point de vue de la détoxification des HAP notamment.

Nous avons mis en évidence que l'inoculation de microcosmes de sol pollué non stérile avec les consortia AT et PY accélère la biodégradation des HAP mais ne modifie pas leur teneur finale dans le sol. Or nous espérons obtenir des taux de dégradation plus élevés.

Nous avons vu qu'une explication à ce relatif échec peut être le fait qu'une microflore dégradatrice très active préexiste dans le sol. Par contre, des auteurs ont remarqué que l'inoculation d'un sol ayant une faible capacité de dégradation d'un HAP avec des micro-organismes dégradant ce HAP augmentait significativement les taux de dégradation du HAP concerné.

Il serait donc certainement judicieux de réaliser l'inoculation de sols pollués dans lesquels la biodégradation naturelle des HAP (acénaphthylène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène) est plus faible. Il serait alors envisageable, si la biodégradation est augmentée, d'utiliser les micro-organismes que nous avons sélectionnés pour la biorémediation de tels sols.

Enfin, l'addition de nutriments peut avoir une influence sur la cinétique et l'efficacité de la biodégradation des HAP, celle des plus gros en particulier, différents phénomènes pouvant alors se produire dans le sol.

Si la population qui s'y développe est capable de dégrader les HAP (directement ou par cométabolisme), la biodégradation peut être augmentée.

Mais cette population microbienne dégradatrice peut également se détourner vers un substrat préférentiel ou perdre ses capacités de dégradation, ou même être « étouffée » par une autre population présente dont le taux de croissance sera plus élevé (phénomène de compétition) dans les nouvelles conditions.

L'addition de surfactants est une autre possibilité, mais nous avons vu que les effets sur la dégradation des HAP peuvent être contraires à ceux escomptés.



D'autres méthodes peuvent être combinées à la biodégradation des HAP pour dépolluer des sol contaminés quand il apparaît que la biodégradation (optimisée) seule ne permet pas d'atteindre des niveaux acceptables.

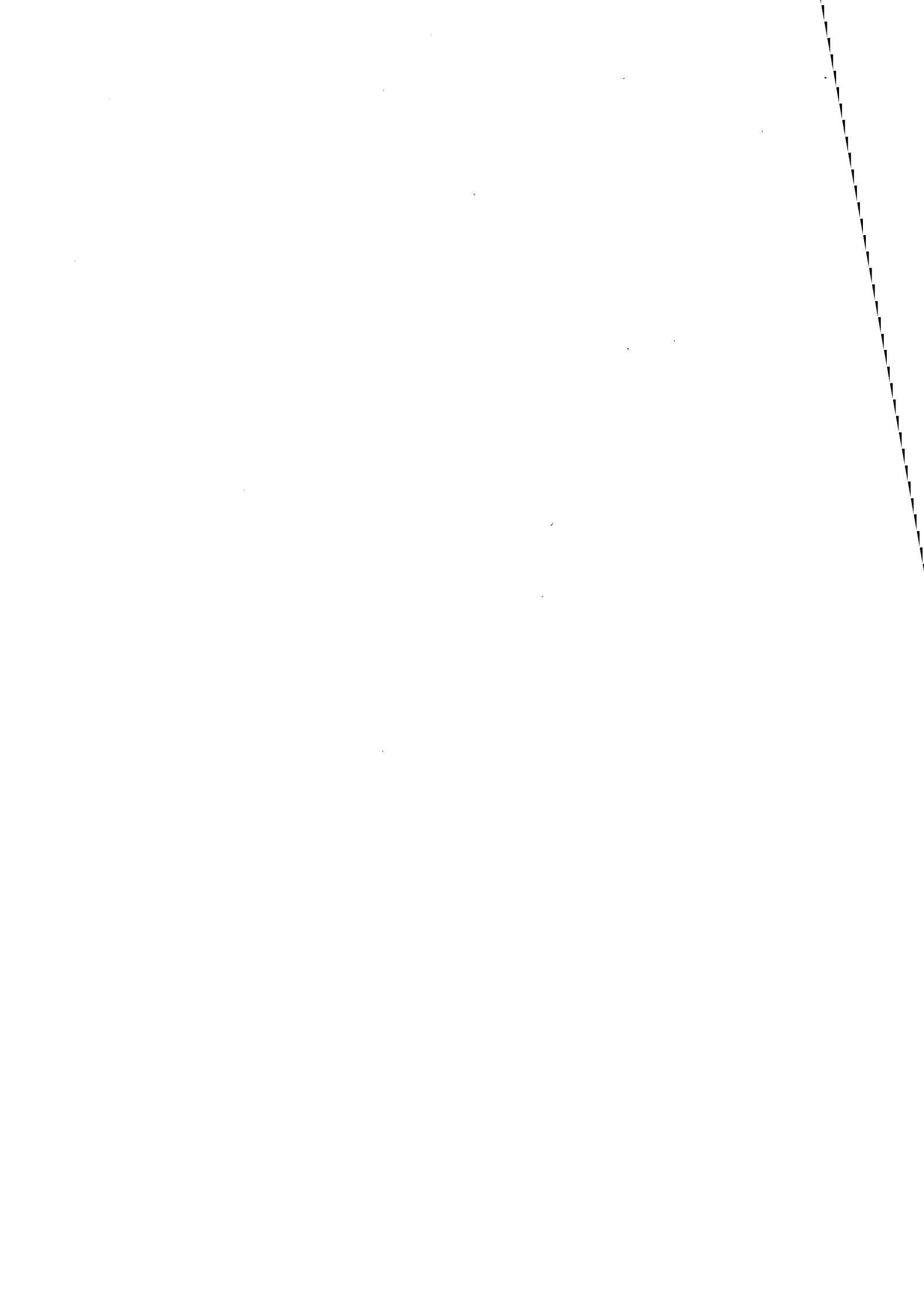
Des molécules polluantes sont en effet inaccessibles aux micro-organismes : les molécules polluantes sont de taille bien inférieure aux micro-organismes (rapport de l'ordre de 1000 avec les bactéries), elles peuvent donc être non biodisponibles en se fixant dans des pores inaccessibles aux bactéries et même aux enzymes extracellulaires.

Il peut donc être nécessaire, soit de les rendre disponibles (surfactants, solvants,...), soit de les éliminer par d'autres voies (physiques ou chimiques par exemple), car des modifications des conditions environnementales sont toujours susceptibles d'intervenir pour contribuer à leur libération dans l'environnement.

Des essais dans ce sens peuvent être envisagés.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**



- Aelion C.M., Swindoll C.M., Pfaender K., 1987**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.53, n°9, 2212-2217 : Adaptation to and biodegradation of xenobiotic compounds by microbial communities from a pristine aquifer.
- Al-Bahrani K.S., Martin R.J., 1976**, Wat. Res., Vol.10, 731-736 : Adsorption studies using gas-liquid chromatography - I. Effect of molecular structure.
- Alexander M., 1977**, John Wiley and sons, Inc. New York, "Introduction to soil microbiology", 2<sup>nd</sup> edition.
- Alexander M., 1981**, Science, Vol.211, 132-138 : Biodegradation of chemicals of environmental concern.
- Ambujom S., Manilal V.B., 1995**, Biotechnol. Lett., Vol.17, n°4, 443-448 : Phenol degradation by a stable aerobic consortium and its bacterial isolates.
- Andersson B.E., Henrysson T., 1996**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.46, 647-652 : Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi.
- Andrews A.W., Thibault L.H., Lijinsky W., 1978**, Mutation Res., Vol. 51, 311-318 : The relationship between carcinogenicity and mutagenicity of some polynuclear hydrocarbons.
- Aprill W., Sims R.C., 1990**, Chemosphere, Vol.20, 253-265 : Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treatment in soil.
- Aronstein B.N., Alexander M., 1993**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.39, 386-390 : Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic hydrocarbons within the soil.
- Ashok B.T., Saxena S., Musarrat J., 1995**, Letters in Appl. Microbiol., Vol.21, 246-248 : Isolation and characterization of four polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from soil near an oil refinery.
- Atlas R.M., Bartha R., 1972**, Biotech. Bioeng., Vol.14, 309-318 : Degradation and mineralization of petroleum in seawater : limitation by nitrogen and phosphorus.
- Atlas R.M., 1977**, Crit. Rev. Microbiol., Vol.5, 371-386 : Stimulated petroleum biodegradation.
- Atlas R.M., Bartha R., 1993**, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, "Microbial Ecology : fundamentals and applications", 3<sup>rd</sup> edition.
- Babich H., Stotzky G., 1977**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.33, 369-473 : Reductions in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals.
- Babich H., Stotzky G., 1979**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.38, 501-513 : Abiotic factors affecting the toxicity of lead to fungi.
- Baes C.F., Sharp R.D., 1983**, J. Environ. Qual., Vol.12, 17-28 : A proposal for estimation of soil leaching constants for use in assessment models.
- Barnsley E.A., 1975**, Can. J. Microbiol., Vol.21, 1004-1008 : The bacterial degradation of fluoranthene and benzo(a)pyrene.
- Baud-Grasset F., Baud-Grasset S., Safferman S., 1993**, Chemosphere, Vol.26, n°7, 1365-1374 : Evaluation of the bioremediation of a contaminated soil with phytotoxicity tests.
- Beam H.W., Perry J.J., 1974**, J. Gen. Microbiol., Vol.82, 163-169 : Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via cometabolism and commensalism.
- Belkin S., Stieber M., Tiehm A., Frimmel F.H., Abeliiovitch A., Werner P., Ulitzur S., 1994**, Environ. Toxicol. Wat. Qual., Vol.9, 303-309 : Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons degradation.
- Bidaud C., Tran-Minh C., 1998**, J. Mol. Cat. B : Enzymatic, Vol.5, n°1-4, 377-381 : Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation in the soil of a former gasworks site : selection and study of PAHs-degrading microorganisms.

- Bogan B.W., Lamar R.T., 1995**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.61, n°7, 2631-2635 : One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*.
- Boldrin B., Tiehm A., Fritzsche C., 1993**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.59, n°6, 1927-1930 : Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp..
- Bollag J.M., Loll M.J., 1983**, Experientia, Vol.39, 1221-1231 : Incorporation of xenobiotics into soil humus.
- Bollag J.M., Liu S.Y., 1990**, H.H. Cheng (ed.), Soil Sci. Soc. Am. Inc. Madison, USA, In "Pesticides in the soil environment : processes, impact and modelling" : Biological transformation processes of pesticides.
- Bonneau M., Souchier B., 1994**, Masson, Paris, "Pédologie. 2 - Constituants et propriétés du sol ", 2<sup>ème</sup> édition.
- Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.P., 1995**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.43, 952-960 : Substrate availability in phenanthrene biodegradation ; transfer mechanism and influence on metabolism.
- Bouchez M., Blanchet D., Vandecasteele J.P., 1996**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.45, 556-561 : The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons : carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds.
- Briggs G.G., 1981**, Austr. J. Soil Res., Vol.19, 61-68 : Adsorption of pesticides by some Australian soils.
- Brodkorb T.S., Legge R.L., 1992**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, n°9, 3117-3121 : Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*.
- Bumpus J.A., 1989**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.55, 154-158 : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*.
- Bumpus J.A., Tien M., Wright D., Aust S.D., 1985**, Science, Vol.228, 1434-1436 : Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus.
- Bury S.J., Miller C.A., 1993**, Environ. Sci. Technol., Vol.27, 104-110 : Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons.
- Caldini G., Cenci G., Manenti R., Morozzi G., 1995**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.44, 225-229 : The ability of an environmental isolate of *Pseudomonas fluorescens* to utilize chrysene and other four-ring polynuclear aromatic hydrocarbons.
- Cerniglia C.E., 1982**, J. Gen. Microbiol., Vol.128, 2055-2061 : Initial reactions in the oxidation of anthracene by *Cunninghamella elegans*.
- Cerniglia C.E., 1992**, Biodegradation, Vol.3, 351-368 : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Cerniglia C.E., Hebert R.L., Szanislo P.J., Gibson D.T., 1978**, Arch. Microbiol., Vol.117, 135-143 : Fungal transformation of naphthalene.
- Cerniglia C.E., Gibson D.T., 1979**, J. Biol. Chem., Vol.254, 12174-12180 : Oxidation of benzo(a)pyrene by the filamentous fungus *Cunninghamella elegans*.
- Cerniglia C.E., Dodge R.H., Gibson D.T., 1980**, Bot. Mar., Vol.23, 121-124 : Studies on the fungal oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Cerniglia C.E., Freeman J.P., Evans F.E., 1984**, Arch. Microbiol., Vol.138, 283-286 : Evidence for an arene oxide-NIH shift pathway in the transformation of naphthalene to 1-naphthol by *Bacillus cereus*.
- Cerniglia C.E., White G.L., Heflich R.H., 1985**, Arch. Microbiol., Vol.143, 105-110 : Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons.

- Cerniglia C.E., Kelly D.W., Freeman J.P., Miller D.W., 1986, Chem. Biol. Inter., Vol.57, 203-216 : Microbial metabolism of pyrene.
- Cerniglia C.E., Sutherland J.B., Crow S.A., 1992, Winkelmann G. (ed), Weinheim, Germany : VCH Verlagsgesellschaft, In "Microbial degradation of natural products", pp. 193-217 : Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons.
- Chiou C.T., Peters L.J., Freed V.H., 1979, Science, Vol. 206, 831-832 : Physical concept of soil-water equilibria for non ionic organic compounds.
- Chiou C.T., Porter P.E., Schmedding D.W., 1983, Environ. Sci. Technol., Vol.17, 227-231 : Partition equilibria of non ionic organic compounds between soil organic matter and water.
- Chiou C.T., Malcolm R.L., Brinton T.L., Kile W.E., 1986, Environ. Sci. Technol., Vol.20, 502-508 : Enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids.
- Churchill P.F., Dudley R.J., Churchill S.A., 1995, Waste Management, Vol. 15, n°5/6, 371-377 : Surfactant-enhanced bioremediation.
- Civilini M., 1994, Microbiology Europe, Vol.2, n°6, 16-24 : Fate of creosote compounds during composting.
- Comeau Y., Greer C.W., Samson R., 1993, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.38, 681-687 : Role of inoculum preparation and density on the bioremediation of 2,4-D-contaminated soil by bioaugmentation.
- Couteaux M.M., Faurie G., Palka L., Steinberg C., 1988, Rev. Ecol. Biol. Sol., Vol.25, 1-31 : La relation prédateur-proie (protozoaires-bactéries) dans les sols : rôle dans la régulation des populations et conséquences sur les cycles du carbone et de l'azote.
- Danganan C.E., Rick W.Y.E., Daubaras D.L., Xun L., Chakrabarty A.M., 1994, Appl. Environ. Microbiol., Vol.60, n°11, 4100-4106 : Nucleotide sequence and functional analysis of the genes encoding 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid oxygenase in *Pseudomonas cepacia* AC1100.
- Danso S.K.A., Keya S.O., Alexander M., 1975, Can. J. Microbiol., Vol.21, 884-885 : Protozoa and the decline of *Rhizobium* populations added to soil.
- Davis A.R., Hardin A.H., 1976, Can. J. Spectroscopy, Vol. 21, n°5, 139-143 : Raman spectral studies of organic molecules adsorbed at model sediment surfaces.
- Deschênes L., Lafrance P., Villeneuve J.P., Samson R., 1996, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.46, 638-646 : Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits PAH biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil.
- Dingyi Y.E., Siddiqi M.A., MacCubbin A.E., Kumar S., Sikka H.C., 1996, Environ. Sci. Technol., Vol.30, 136-142 : Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*.
- Dommergues Y., Mangenot F., 1970, Masson, Paris, "Ecologie microbienne du sol".
- Dragun J., 1988, Hazardous Materials Control Research Institute, Silver Spring, MD, "The soil chemistry of hazardous materials".
- Eaton R.W., Chapman P.J., 1992, J. Bacteriol., Vol.174, 7542-7554 : Bacterial metabolism of naphthalene : construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions.
- England L.S., Lee H., Trevors J.T., 1993, Soil Biol. Biochem., Vol.25, 525-531 : Bacterial survival in soil : effects of clay and protozoa.
- E.R.L. (Environmental Resources Limited), 1987, HMSO, London, "Problems arising from the redevelopment of gasworks and similar sites", 2<sup>nd</sup> edition.
- Evans W.C., Fernley H.N., Griffiths E., 1965, Biochem. J., Vol.95, 819-831 : Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonads*.

- Farmer V.C., Mortland M.M., 1966**, J. Chem. Soc. (A), 344-351 : An infrared study of the coordination of pyridine and water to exchangeable cations in montmorillonite and saponite.
- Field J.A., de Jong E., Feijoo Costa G., de Bont J.A.M., 1992**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, 2219-2226 : Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white-rot fungi.
- Fisher F., Zillig W., Stetter K.D., Schreiber G., 1983**, Nature (London), Vol.301, 511-513 : Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria.
- Flaig W., Beutelspacher H., Rietz E., 1975**, J.E. Gieseking ed., Springer Verlag, Berlin, In "Soil components. Vol.1 : Organic components" : Chemical composition and physical properties of humic substances.
- Foght J.M., Westlake D.W.S., 1996**, Biodegradation, Vol.7, 353-366 : Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-born genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*.
- Fournier J.C., 1989**, Thèse Université de Perpignan, 502 pages, "Aspects du comportement de la microflore dégradant les produits phytosanitaires dans le sol".
- Fujikawa K., Fort F.L., Samejima K., Sakamoto Y., 1993**, Mutation Res., Vol. 290, 175-182 : Genotoxic potency in *Drosophila melanogaster* of selected aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons as assayed in the DNA repair test.
- Gadd G.M., 1990**, In C. Edwards (ed.), McGraw-Hill, New-York, "Microbiology of extreme environments", pp. 147-177 : Metal tolerance.
- Galli E., Berstetti G., Barbieri P., 1985**, Ann. Microbiol., Vol.35, 175-183 : Ruolo dei plasmidi degradativi nel metabolismo dei composti aromatici.
- Gaudet J.P., Jegat H., Vachaud G., Wierenga P.J., 1977**, Soil Sci. Soc. Am. J., Vol.41, n°4, 665-671 : Solute transfer, with exchange between mobile and stagnant water through unsaturated sand.
- George E.J., Neufeld R.D., 1989**, Biotechnol. Bioeng., Vol.33, 1306-1310 : Degradation of fluorene in soil by fungus *Phanerochaete chrysosporium*.
- Gibson D.T., Mahadevan V., Jerina D.M., Yagi H., Yeh H.J.C., 1975**, Science, Vol. 189, 295-297 : Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium.
- Gibson D.T., Subramanian V., 1984**, Gibson D.T. (ed), New York, Marcel Dekker, In "Microbial degradation of organic compounds", pp. 181-252 : Microbial degradation of aromatic hydrocarbons.
- Gilbertson R.L., 1980**, Mycologia, Vol.72, 1-49 : Wood-rotting fungi of North America.
- Goyal A.K., Zylstra G.J. 1996**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.62, n°1, 230-236 : Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39.
- Ghosh M.M., Yeom I.T., Shi Z., 1995**, Hinchee R.E., Anderson D.B., Hoeppe H. (eds), Battelle Press, Ohio, U.S.A., In "Bioremediation of recalcitrant organics", pp.15-23 : Surfactant-enhanced bioremediation of PAH- and PCB-contaminated soils.
- Gottschalk G., Knackmuss H.J., 1993**, Angewandte Chemie International Edition in English, Vol.32, n°10, 1398-1408 : Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally, by combination or by construction.
- Gray M.R., Banerjee D.K., Fedorak P.M., Hashimoto A., Masliyah J.H., Pickard M.A., 1994**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.40, 933-940 : Biological remediation of anthracene-contaminated soil in rotating bioreactors.
- Green R.E., Karickhoff S.W., 1990**, In H.H. Cheng ed., Soil Sci. Soc. Am. Book Series USA, "Pesticides in the soil environment : Processes, Impact and Modelling" : Sorption estimates for modelling.

- Greer C.W., Hawari J., Samson R., 1990**, Arch. Microbiol., Vol.154, 317-322 : Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat.
- Gremm T.J., Frimmel F.H., 1994**, Chromatographia, Vol.38, n°11/12, 781-788 : Application of liquid chromatography-particle beam mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry for the identification of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons.
- Griffiths E., 1965**, Biological Reviews, Vol.40, 129-142 : Microorganisms and soil structure.
- Grifoll M., Casellas M., Bayona J.M., Solanas A.M., 1992**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, 2910-2917 : Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium : identification of ring oxidation and ring fission products.
- Grifoll M., Selifononov S.A., Gatlin C.V., Chapman P.J., 1995**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.61, n°10, 3711-3723 : Actions of a versatile fluorene-degrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds.
- Grosser R.J., Warshawsky D., Vestal J.R., 1991**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.57, n°12, 3462-3469 : Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo(a)pyrene and carbazole in soils.
- Grosser R.J., Warshawsky D., Vestal J.R., 1995**, Environ. Toxicol. Chem., Vol.14, n°3, 375-382 : Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon-contaminated soils.
- Grund E., Denecke B., Eichenlaub R., 1992**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, 1874-1877 : Naphtalene degradation *via* salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4.
- Gunner H.B., Zuckerman B.M., 1968**, Nature (London), Vol.217, 1183-1184 : Degradation of diazinon by synergistic microbial action.
- Hammel K.E., Kalyanaraman B., Kirk T.K., 1986**, J. Biol. Chem., Vol.261, 16948-16952 : Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo(p)dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase.
- Hammel K.E., Green B., 1991**, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.88, 10605-10608 : Ring fission of anthracene by a eukaryote.
- Hammel K.E., Gai W.Z., Green B., Moen M.A., 1992**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, 1832-1838 : Oxidative degradation of phenanthrene by the lignolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*.
- Hattori T., 1973**, Marcel Dekker Inc. New York, "Microbial life in the soil. An introduction".
- Hattori T., 1988**, Rep. Inst. Agric. Res. Tokyo Univ., Vol.37, 23-36 : Soil aggregates as microhabitats of microorganisms.
- Heitkamp M.A., Franklin W., Cerniglia C.E., 1988a**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, 2549-2555 : Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium.
- Heitkamp M.A., Freeman J.P., Miller D.W., Cerniglia C.E., 1988b**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, 2556-2565 : Pyrene degradation by a *Mycobacterium* : identification of ring oxidation and ring fission products.
- Heitzer A., Sayler G.S., 1993**, Tibtech., Vol.11, 334-343 : Monitoring the efficacy of bioremediation.
- Hofmann K.H., 1986**, J. Basic Microbiol., Vol.26, 109-111 : Oxidation of naphtalene by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*.
- Huang J.C., Liao C.S., 1970**, Journal of the Sanitary Engineering Division, Proceedings of the American Society of Civil Engineers 96 (SA5), 1057-1078 : Adsorption of pesticides by clay minerals.



- INRS, 1979**, Cahiers de Notes Documentaires, n°95, 341-343 : Fiche toxicologique n°144. Benzo(a)pyrène.
- INRS, 1984**, Cahiers de Notes Documentaires, n°117, 591-594 : Fiche toxicologique n°204. Naphtalène.
- Jackman S.C., Lee H., Trevors J.T., 1992**, Microb. Releases, Vol.1, 125-154 : Survival, detection and containment of bacteria.
- Jahnke M., El-Banna T., Klintworth R., Auling G., 1990**, J. Gen. Microbiol., Vol.136, 2241-2249 : Mineralization of orthoanilic acid is a plasmid-associated trait in *Alcaligenes* sp. O-1.
- Jocteur-Monrozier L., Ladd J.N., Fitzpatrick R.E., Foster R.C., Ranpach M., 1991**, Geoderma, Vol.49, 37-62 : Components and microbial biomass content of size fractions from soils of contrasting aggregation.
- Johnson W.P., Amy G.L., 1995a**, Environ. Sci. Technol., Vol.29, 807-817 : Facilitated transport and enhanced desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by natural organic matter in aquifer sediments.
- Johnson W.P., Amy G.L., Chapra S.C., 1995b**, J. Environ. Engin., 438-446 : Modeling of NOM-facilitated PAH transport through low- $f_{oc}$  sediment.
- Juhasz A.L., Britz M.L., Stanley G.A., 1996**, Biotechnol. Letters, Vol.18, N°5, 577-582 : Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*.
- Jury W.A., Spencer W.F., Farmer W.J., 1983**, J. Environ. Qual., Vol.13, 567-572 : Behaviour assessment model for trace organics in soil. I-Model description.
- Jury W.A., Farmer W.J., Spencer W.F., 1984**, J. Environ. Qual., Vol.13, 567-572 : Behaviour assessment model for trace organics in soil. II-Chemical classification and parameter sensitivity.
- Karickhoff S.W., 1981**, Chemosphere, Vol.10, 833-846 : Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils.
- Karickhoff S.W., 1984**, J. Hydraul. Eng., Vol.110, 707-735 : Organic pollutant sorption in aquatic systems.
- Karickhoff S.W., Brown D.S., Scott T.A., 1979**, Wat. Res., Vol.13, 241-248 : Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments.
- Kästner M., Breuer-Jammali M., Maro B., 1994**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.41, 267-273 : Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).
- Keck J., Sims R.C., Coover M., Park K., Symons B., 1989**, Wat. Res., Vol.23, 1467-1476 : Evidence for cooxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in soil.
- Kelley I., Freeman J.P., Cerniglia C.E., 1990**, Biodegradation, Vol.1, 283-290 : Identification of metabolites from degradation of naphtalene by a *Mycobacterium* sp..
- Kennes C., Lema J.M., 1994**, Biotechnol. Letters, Vol.16, n°7, 759-764 : Degradation of major compounds of creosotes (PAHs and phenols) by *Phanerochaete chrysosporium*.
- Kilbertus G., 1980**, Rev. Eco. Biol. Sol., Vol.17, n°4, 543-557 : Etude des microhabitats contenus dans les agrégats de sol. Leurs relations avec la biomasse bactérienne et la taille des procaryotes présents.
- Kiyohara H., Nagao K., Nomi R., 1976**, Agric. Biol. Chem., Vol.40, 1075-1082 : Degradation of phenanthrene through *o*-phtalate by an *Aeromonas* sp..
- Kiyohara H., Nagao K., Yana K., 1982**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.43, n°2, 454-457 : Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates.
- Kiyohara H., Takizawa N., Nagao K., 1992**, J. Ferment. Bioeng., Vol.74, n°1, 49-51 : Natural distribution of bacteria metabolizing many kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons.

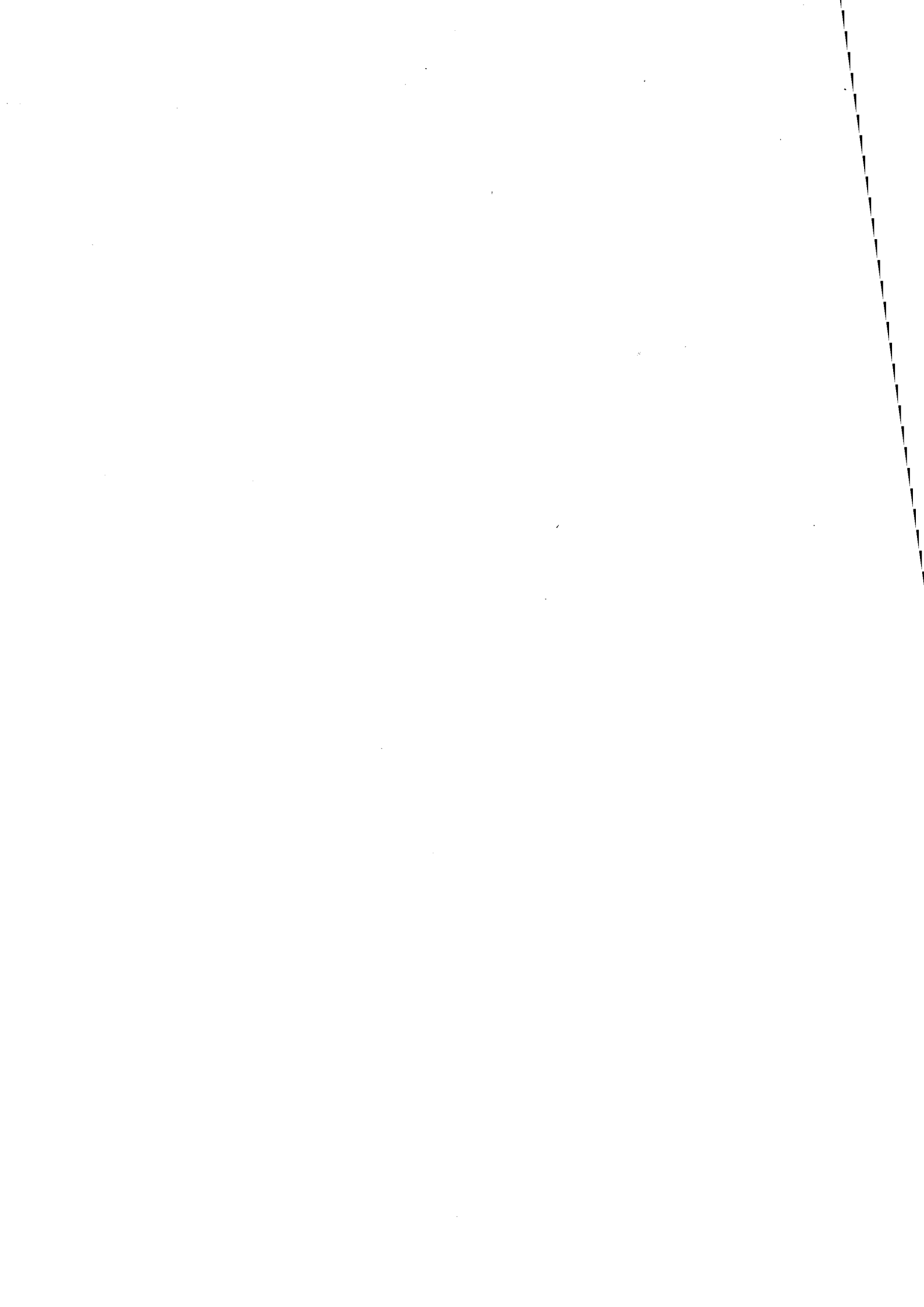
- Komatsu T., Omori T., Komada T., 1993**, Biosci. Biotech. Biochem., Vol.57, n°5, 864-865 : Microbial degradation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphtene and acenaphtylene by a pure bacterial culture.
- Koskinen W.C., Harper S.S., 1990**, H.H. Cheng ed., Soil Sci. Soc. Am. Book Series USA, In "Pesticides in the soil environment : Processes, Impact and Modelling" : The retention process: mechanisms.
- Kotterman M.J.J., Rietberg H.J., Hage A., Field J.A., 1988**, Biotech. Bioeng., Vol.57, n°2, 220-227 : Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants.
- Krieg N.R., Holt J.G., (eds.), 1984**, Williams&Wilkins, Baltimore (London), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1".
- Kuhnt G.E., 1993**, Environ. Toxicol. Chem., Vol.12, 1813-1820 : Behavior and fate of surfactants in soil.
- Ladd J.N., Parsons J.W., Amato M., 1977a**, Soil Biol. Biochem., Vol.9, 309-318 : Studies on nitrogen immobilization and mineralization in calcareous. I. Distribution of immobilized nitrogen among soil fractions of different particle size and density.
- Ladd J.N., Parsons J.W., Amato M., 1977b**, Soil Biol. Biochem., Vol.9, 309-318 : Studies on nitrogen immobilization and mineralization in calcareous. II. Mineralization of immobilized nitrogen from soil fractions of different particle size and density.
- Laha S., Luthy R.G., 1991**, Environ. Sci. Technol., Vol.25, 1920-1930 : Inhibition of phenanthrene mineralization by non-ionic surfactants in soil-water systems.
- Landrum P.F., Nihart S.R., Eadle B.J., Gardner W.S., 1984**, Environ. Sci. Technol., Vol.18, 187-192 : Separation method for determining pollutant binding to Aldrich humic acid and dissolved organic carbon of natural waters.
- Lee L.S., Rao P.S.C., Nkedi-Kissa P., Delfino J.J., 1990**, Environ. Sci. Technol., Vol.24, 654-661 : Influence of solvent and sorbent characteristics on distribution of pentachlorophenol in octanol-water and soil-water systems.
- Lotka A.J., 1925**, Williams & Wilkins, Baltimore, "Elements of physical biology".
- MacGillivray A.R., Shiaris M.P., 1993**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.59, 1613-1618 : Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments.
- MacGroddy S.E., Farrington J.W., Gschwend P.M., 1996**, Environ. Sci. Technol., Vol.30, 172-177 : Comparison of the *in situ* and desorption sediment-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls.
- Madsen E.L., 1991**, Environ. Sci. Technol., Vol.25, n°10, 1663-1673 : Determining *in situ* biodegradation. Facts and challenges.
- Magee, B.R., Lion L.W., Lemley A.T., 1991**, Environ. Sci. Technol., Vol.25, 323-331 : Transport of dissolved organic molecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media.
- Mahaffey W.R., Gibson D.T., Cerniglia C.E., 1988**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, 2415-2423 : Bacterial oxidation of chemical carcinogens : formation of polycyclic aromatic acids from benz(a)anthracene.
- Mahmoud S.K., Rama Rao P., 1993**, Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol.50, 486-491 : Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil.
- Marquès S., Ramas J.L., 1993**, Mol. Microbiol., Vol.9, n°5, 923-929 : Transcriptional control of the *Pseudomonas putida* TOL plasmid catabolic pathways.
- Martins J., 1993**, Thèse Université de Grenoble I, 305 pages, "Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et biologiques du devenir des pesticides dans les sols : application au transfert du pentachlorophénol en colonnes".

- Means J.C., Wood S.G., Hassett J.J., Banwart W.L., 1980**, Environ. Sci. Technol., Vol.14, n°12, 1524-1528 : Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils.
- Mihelcic J.R., Luthy R.G., 1988**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.54, 1188-1198 : Microbial degradation of acenaphthene and naphthalene under denitrification conditions in soil-water systems.
- Ministère de l'Environnement, 1994**, Direction de la prévention des pollutions et des risques, "Recensement des sites et sols pollués 1994".
- Molope M.B., Grieve I.C., Page E.R., 1987**, J. Soil Sci., Vol.38, 71-77 : Contributions by fungi and bacteria to aggregate stability of cultivated soils.
- Monna L., Omori T., Kodama T., 1993**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.59, 285-289 : Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63.
- Monticello D.J., Bakker D., Finnerty W.R., 1985**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.49, n°4, 756-760 : Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species.
- Montgomery J.H., 1991**, Lewis Publisher Inc., Michigan, U.S.A., "Groundwater chemicals field guide".
- Morgan P., Watkinson R.J., 1989**, CRC Crit. Rev. Biotechnol., Vol.8, n°4, 305-333 : Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment.
- Mueller J.G., Chapman P., Pritchard P.H., 1989a**, Environ. Sci. Technol., Vol.23, n°10, 1197-1201 : Creosote-contaminated sites, their potential for bioremediation.
- Mueller J.G., Chapman P.J., Pritchard P.H., 1989b**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.55, n°12, 3085-3090 : Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote.
- Mueller J.G., Chapman P.J., Blattmann B.O., Pritchard P.H., 1990**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.56, n°4, 1079-1086 : Isolation and characterization of a fluoranthene-utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*.
- Nkedi-Kizza P., Rao P.S.C., Hornsby A.G., 1985**, Environ. Sci. Technol., Vol.19, 975-979 : Influence of organic cosolvents on sorption of hydrophobic organic chemicals by soils.
- Oberbremer A., Müller-Hurtig R., Wagner F., 1990**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.32, 485-489 : Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor.
- Otte M.P., Gagnon J., Comeau Y., Matte N., Greer C.W., Samson R., 1994**, Appl. Environ. Biotechnol., Vol.40, 926-932 : Activation of an indigenous microbial consortium for bioaugmentation of pentachlorophenol/creosote contaminated soils.
- Paul E.A., Clark F.E., 1989**, Academic Press Inc, San Diego, Ca., "Soil microbiology and biochemistry".
- Pohunek M., 1961**, J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immunol. (Prague), Vol.5, 267-270 : *Streptococci* antagonizing the vaginal *Lactobacillus*.
- Pothuluri J.V., Freeman J.P., Evans F.E., Cerniglia C.E., 1990**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.56, 2974-2983 : Fungal transformation of fluoranthene.
- Pothuluri J.V., Heflich R.H., Fu P.P., Cerniglia C.E., 1992**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.58, 937-941 : Fungal metabolism and detoxification of fluoranthene.
- Pritchard P.H., O'Neill E.J., Spain C.M., Ahearn D.G., 1987**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.53, n°8, 1833-1838 : Physical and biological parameters that determinate the fate of *p*-chlorophenol in laboratory test systems.
- Providenti M.A., Flemming C.A., Lee H., Trevors J.T., 1995**, FEMS Microbiol. Ecol., Vol.17, 15-26 : Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries.

- Putcha R.V., Domach M.M., 1993**, Environ. Progress, Vol.12, n°2, 81-85 : Fluorescence monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and effects of surfactants.
- Rittman B.E., MacCarthy P.L., 1980**, Biotech. Bioeng., Vol.22, n°11, 2343-2373 : Model of steady-state biofilm kinetics.
- Rodier J., 1971**, Dunod, Paris, "L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau", 4<sup>ème</sup> Edition.
- Roper M.M., Marshall K.C., 1974**, Microb. Ecol., Vol.1, 1-14 : Modification of interaction between *Escherichia coli* and bacteriophage in saline sediment.
- Roper M.M., Marshall K.C., 1978**, Microbial Ecol., Vol.4, 279-290 : Effects of a clay mineral on microbial predation and parasitism on *Escherichia*.
- Sack U., Günther T., 1993**, J. Basic Microbiol., Vol.33, 269-277 : Metabolism of PAH by fungi and correlation with extracellular enzymatic activities.
- Sariaslani F.S., Stahl R.G. Jr., 1990**, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.166, 743-749 : Activation of promutagenic chemicals by *Streptomyces griseus* containing cytochrome P-450<sub>soy</sub>.
- Sariaslani F.S., Omer C.A., 1992**, Crit. Rev. Plant Sci., Vol.11, 1-16 : Actinomycetes cytochrome P-450 involved in oxidative metabolism : Biochemistry and molecular biology.
- Selifonov S.A., Grifoll M., Gurst J.E., Chapman P.J., 1993a**, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.193, 67-76 : Isolation and characterization of (+)-1,1a-dihydroxy-1-hydrofluoren-9-one formed by angular dioxygenation in the bacterial catabolism of fluorene.
- Selifonov S.A., Slepkin A.V., Adanin V.M., Grechkina G.M., Starovoitov I.I., 1993b**, Microbiology, Vol.62, 85-92 : Acenaphtene catabolism by strains of *Alcaligenes eutrophus* and *Alcaligenes paradoxus*.
- Shields M.S., Hooper S.W., Sayler G.S., 1985**, J. Bacteriol., Vol.163, n°3, 882-889 : Plasmid-mediated mineralization of 4-chlorobiphenyl.
- Shiu W.-Y., Mackay D., 1997**, J. Chem. Eng. Data, Vol.42, 27-30 : Henry's law constants of selected aromatic hydrocarbons, alcohols, and ketones.
- Shuttleworth K.L., Cerniglia C.E., 1995**, Appl. Biochem. Biotechnol., Vol.5, 291-302 : Environmental aspects of PAH biodegradation.
- Shuttleworth K.L., Cerniglia C.E., 1996**, Microb. Ecol., Vol.31, 305-317 : Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene.
- Sims R.C., Doucette W.J., McLean J.E., Grenney W.J., Dupont R.R., 1988**, US E.P.A., Ada, OK, EPA/600/6-88/001 : Treatment potential for 56 EPA listed hazardous chemicals in soil.
- Sims J.L., Sims R.C., Matthews J.E., 1990**, Hazard. Waste & Hazard. Mat., Vol.7, n°2, 117-149 : Approach to bioremediation of contaminated soil.
- Slater J.H., Lovatt D., Weightman A.J., Bull A.T., 1979**, J. Gen. Microb., Vol.114, 125-136 : The growth of *Pseudomonas putida* on chlorinated aliphatic acids and its dehalogenase activity.
- Slobodkin L.B., 1968**, American Zoologist, Vol.8, 43-51 : How to be a predator.
- Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds.), 1986**, Williams & Wilkins, Baltimore (London), "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2".
- Spain J.C., 1990**, A.C.S. Symposium Series, In "Enhanced biodegradation of pesticides in the environment" : Microbial adaptation in aquatic ecosystems.
- Sposito G., 1989**, Oxford University Press, New York, "The chemistry of soils".
- Stotzky G., Norman A.G., 1964**, Can. J. Microbiol., Vol.10, 143-149 : Factors limiting bacterial activities in soil. Part III : Supplementary substrate addition.
- Stotzky G., Rem L.T., 1966**, Can. J. Microbiol., Vol.12, 547-563 : Influence of clay minerals on microorganisms : I. Montmorillonite and kaolinite on bacteria.

- Stotzky G., Rem L.T., 1967**, Can J. Microbiol., Vol.13, 1535-1550 : Influence of clay minerals on microorganisms : I. Montmorillonite and kaolinite on fungi.
- Stringfellow W.T., Aitken M.D., 1995**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.61, n°1, 357-362 : Competitive metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes and fluorene by phenanthrene degrading *Pseudomonads*.
- Strong-Gunderson J.M., Palumbo A.V., 1995**, Hinchee R.E., Anderson D.B., Hoepfel H. (eds), Battelle Press, Ohio, U.S.A., In "Bioremediation of recalcitrant organics", pp.33-40 : Bioavailability enhancement by addition of surfactant and surfactant-like compounds.
- Sutherland J.B., Selby A.L., Freeman J.P., Fu P.P., Miller D.W., Cerniglia C.E., 1992**, Mycol. Res., Vol. 96, 509-517 : Identification of xyloside conjugates formed from anthracene by *Rhizoctonia solani*.
- Sutherland J.B., Fu P.P., Yang S.K., Von Tungeln L.S., Casillas R.P., Crow S.A., Cerniglia C.E., 1993**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.59, 2145-2149 : Enantiomeric composition of the *trans*-dihydrodiols produced from phenanthrene by fungi.
- Swisher R.D., 1987**, Marcel Dekker, New York, NY, "Surfactant biodegradation".
- Tan K.H., 1978**, Soil Sci., Vol.125, 351-358 : Variations in soil humic compounds as related to regional and analytical differences.
- The Merck Index, 1989**, 11<sup>th</sup> edition, Merck&co. Inc., Rahway, New Jersey, U.S.A..
- Thibault S., Anderson M., Frankenberger W.T. Jr., 1996**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.62, n°1, 283-287 : Influence of surfactants on pyrene desorption and degradation in soils.
- Thomas J.M., Yordy J.R., Amador J.A., Alexander M., 1986**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.52, n°2, 290-296 : Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds.
- Thomas A.O., Johnston P.M., Lester J.N., 1991**, Hazard. Waste & Hazard. Mat., Vol.8, n°4, 341-365 : The characterization of the subsurface at former gaswork sites in respect with *in situ* microbiology, chemistry, and physical structure.
- Thomas A.O., Lester J.N., 1993a**, Environ. Technol., Vol.14, 1-24 : The microbial remediation of former gaswork sites - A review.
- Thomas A.O., Lester J.N., 1993b**, Hazard. Waste & Hazard. Mat., Vol.10, n°4, 413-430 : Degradation of phenols using bacteria isolated from the subsurface of manufactured gas plants.
- Tiehm A., 1994**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.60, 258-263 : Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of surfactants.
- Tisdall J.M., Oades J.M., 1982**, J. Soil Sci., Vol.32, 141-163 : Organic matter and water stable aggregates in soil.
- Trower M.K., Sariaslani F.S., Kitson F.G., 1988**, Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.157, 1417-1422 : Xenobiotic oxidation by cytochrome-P450-enriched extracts of *Streptomyces griseus*.
- Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P., 1995**, Can. J. Microbiol., Vol.41, 470-476 : Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil.
- Tsomides H.J., Hughes J.B., Thomas J.M., Ward C.H., 1995**, Environ. Toxicol. & Chem., Vol.14, n°6, 953-959 : Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments.
- Van der Meer J.R., de Vos W.M., Harayama S., Zehnder A.J.B., 1992**, Microbiol. Rev., Vol.56, 677-694 : Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds.
- Vargas R., Hattori T., 1986**, FEMS Microbiol. Ecol., Vol.38, 233-242 : Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates.

- Veldkamp H., van Gernerden H., Harder W., Laanbroek H.J., 1984**, In Klug A.J., Reddy C.A. (eds), American Society for Microbiology, Washington DC, "Current perspectives in microbial ecology", pp.279-280 : Competition among bacteria : an overview.
- Volkering F., Breure A.M., Sterkenburg A., van Andel J.G., 1992**, Appl. Environ. Biotechnol., Vol.36, 548-552 : Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons : effect of substrate availability on bacterial growth kinetics.
- Walter U., Beyer M., Klein J., Rehm H.-J., 1991**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.34, 671-676 : Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. UW1.
- Warshawsky D., Radike M., Jayasimhulu K., Cody T., 1988**, Biochem. Biophys. Res., Vol.152, 540-544 : Metabolism of benzo(a)pyrene by a dioxygenase system of the freshwater green alga *Selenastrum capricornutum*.
- Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R., Schumann B., Ladow K., Schneider J., 1995**, Chem. Biol. Int., Vol.97, 131-148 : Biotransformation of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light.
- Weinberg S.R., Stotzky G., 1972**, Soil Biol. Biochem., Vol.4, 171-180 : Conjugation and genetic recombination of *Escherichia coli* in soil.
- Weissenfels W.D., Beyer M., Klein J., 1990**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.32, 479-484 : Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures.
- Weissenfels W.D., Beyer M., Klein J., Rehm H.J., 1991**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.34, 528-535 : Microbial metabolism of fluoranthene : isolation and identification of ring fission products.
- Weissenfels W. D., Klewer H.-J., Langhoff J., 1992**, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.36, 689-696 : Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles : influence on biodegradability and biotoxicity.
- Wilcock R.J., Corban G.A., Northcott G.L., 1996**, Environ. Toxicol. Chem., Vol.15, n°5, 670-676 : Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surficial sediment of an intertidal sandflat.
- Wischmann H., Steinhart H., Hupe K., Montresori G., Stegmann R., 1996**, Intern. J. Environ. Anal. Chem., Vol.64, 247-255 : Degradation of selected PAHs in soil/compost and identification of intermediates.
- Wolin M.J., 1969**, Appl. Microbiol., Vol.17, 83-87 : Volatile fatty acids and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid.
- Xu J.G., Feng Y., Johnson R.L., McNabb D.H., 1995**, Environ. Technol., Vol.16, 587-594 : Pore structures of oil-contaminated, aggregated oil-contaminated and uncontaminated soils in relation to microbial activity.
- Zajic J.E., Guignard H., Gerson D.F., 1977**, Biotechnol. Bioeng., Vol.19, 1303-1320 : Properties and biodegradation of a bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarboclastus*.
- Zhang Y., Miller R.M., 1995**, Appl. Environ. Microbiol., Vol.61, n°6, 2247-2251 : Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-alkanes.



# **ANNEXES**





## ANNEXE 1 : Milieux courants en bactériologie

### Composition de différents milieux nutritifs utilisés en bactériologie

(Formules en g/l d'eau distillée)

**Gélose nutritive :** Extrait de viande de bœuf 5  
Peptone 3  
pH=6,8

**Gélose au sang :** Infusion de cœur et de muscle 37,5  
bio-Thione 10  
Chlorure de sodium 5  
Agar 15  
pH=7,3

**Gélose pour *Pseudomonas* (King B):**

bio-Polytone 20  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5  
MgSO<sub>4</sub> 1,5  
Agar 14  
pH=7,2

**Gélose de Sabouraud :**

bio-Thione	3	Glucose	19
bio-Trypcase	3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
bio-Soyase	3	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
Extrait de levure	2		
Extrait de malt	1	pH=6,4	
Agar	13		

**Gélose de Sabouraud à la gentamicine et au chloramphénicol :**

Gélose de Sabouraud 45  
Gentamicine 0,1  
Chloramphénicol 0,05  
pH=6,8

## ANNEXE 2-a : Protocole de la coloration de Gram

### Solution mère de cristal violet :

Solution A :

cristal violet      2g  
éthanol 95%      20ml

mélanger les solutions A et B

Solution B :

oxalate d'ammonium      0,8g  
eau milliQ      20ml

**Solution de lugol :** Iode : 1g ; Iodure de potassium : 2g ; eau milliQ : 300ml.

**Solution décolorante :** Mélange acétone : alcool (50 :50).

**Solution de safranine :** Safranine : 2,5g ; éthanol 95% : 100ml ; eau milliQ : qsp 1000 ml.

### Coloration :

Plonger les lames :

1 mn dans la solution de cristal violet au 1/5 ; rincer à l'eau distillée

30s dans la solution de lugol ; rincer à l'eau distillée

5s dans le décolorant ; rincer à l'eau distillée

10s dans la solution de safranine ; rincer à l'eau distillée

**Observation** au microscope optique avec l'objectif à immersion au grossissement final x1000.

## ANNEXE 2-b : Préparation de bactéries pour observation en microscopie électronique à balayage.

### Préparation de la suspension bactérienne :

Préparer une suspension d'absorbance à 600 nm égale à 0,4.

Prélever 1 ml de cette suspension et la diluer dans 20ml de tampon phosphate 0,1M, pH=7,0.

### Préparation de la membrane :

Filtrer la suspension diluée sur une membrane Anopore 0,1 $\mu$ m (Whatman).

Mettre 2ml de tampon phosphate 0,1M, pH=7,0 à 2% de glutaraldéhyde (Sigma) sur la membrane.

Incuber 1h.

Rincer 3 fois avec 10ml de tampon phosphate 0,1M, pH=7,0.

Déshydrater à l'éthanol (99,9%) en mettant des solutions de concentrations croissantes en éthanol sur la membrane : 10ml, 10mn chaque concentration de 20%, 50%, 75%, 95% et enfin 100% (dilutions faites dans l'eau milliQ).

Mettre 1ml de tétraméthylsilane (Sigma) sur la membrane et laisser évaporer.

Métalliser à l'or avant observation au microscope électronique à balayage.

**ANNEXE 3 : Tests biochimiques et de croissance des galeries  
d'identification MicroScan Pos Combo Type 4I (Dade Behring S.A.)  
pour bactéries à Gram positif.**

<b>Réactifs et caractères d'identification</b>	
Cristal Violet (CV)	La croissance en présence de cristal violet est utilisée pour différencier les streptocoques (positifs) des staphylocoques (négatifs pour la plupart).
Dépistage des micrococcus (MS)	La croissance en présence d'une faible concentration de bacitracine (0,05µg/ml) est utilisée pour différencier les staphylocoques (positifs) des microcoques (négatifs).
Nitrate (NIT)	La réduction du nitrate en nitrite est détectée par l'apparition d'une couleur rouge après addition d'acide sulfanilique et de N,N-diméthylalphanaphtylamine. Les streptocoques sont négatifs au nitrate alors que la plupart des staphylocoques sont positifs au nitrate.
Novobiocine (NOV)	La résistance à de faibles concentrations de novobiocine (1,6µg/ml) est caractéristique des <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> et <i>Staphylococcus sciuri</i> . Les autres staphylocoques sont sensibles à la novobiocine.
PNP-β-D-Glucuronide (PGR) et PNP-β-D-Galactopyranoside (PGT)	La capacité d'un germe à synthétiser une glycosidase spécifique est détectée par l'hydrolyse du complexe carbohydate/β-naphtylamine qui libère du p-nitrophénol jaune.
Phosphate d'Indoxyle (IDX)	L'hydrolyse du phosphate d'indoxyle par l'indoxyle phosphatase entraîne la formation d'un précipité bleu. La plupart des staphylocoques coagulase et DNase-positifs sont positifs à l'IDX.
Voges-Proskauer (VP)	L'acétylméthylcarbinol, produit à partir du glucose, réagit avec l'hydroxyde de potassium (40%) et l'α-naphtol (5%) pour donner une coloration rouge.
Optochine (OPT)	La sensibilité à l'optochine est caractéristique de <i>Streptococcus pneumoniae</i> . Les autres streptocoques et staphylocoques ne sont pas inhibés par l'optochine.
Phosphatase (PHO)	La phosphatase alcaline hydrolyse le p-nitrophényl-phosphate en phosphate inorganique et en p-nitrophénol, lequel présente une couleur jaune.
40% Bile Esculine (ESC)	Les germes capables de pousser en présence de 40% de bile et d'hydrolyser l'esculine sont détectés par l'apparition d'un précipité noir, résultant de la réaction entre le produit d'hydrolyse de l'esculine et le citrate ferrique. Les streptocoques du groupe D, quelques streptocoques viridans, et quelques staphylocoques y sont positifs.
L-Pyrrolidonyl-β-naphtylamide (PYR)	Les germes qui produisent de la pyrrolidonase coupent le L-pyrrolidonyl-β-naphtylamide en L-pyrrolidonyl et en β-naphtylamide qui se combine avec le réactif peptidase (p-diméthyl-aminocinnamaldéhyde) pour former une coloration rouge

Arginine (ARG)	La déshydrolyse de l'arginine entraîne une alcalinisation du milieu, détectée par le rouge de phénol qui vire du jaune au rouge.
Urée (URE)	L'uréase coupe l'urée en libérant de l'ammoniaque. L'augmentation du pH qui en résulte est détectée par le rouge de phénol.
Raffinose (RAF), Lactose (LAC), Trehalose (TRE), Mannose (MNS), Sorbitol (SOR), Arabinose (ARA), Ribose (RBS), Inuline (INU), Mannitol (MAN)	La fermentation d'un carbone spécifique entraîne la formation d'acide. La diminution de pH consécutive est détectée par le rouge de phénol qui vire au jaune.
Chlorure de sodium 6,5% (NACL)	La tolérance au chlorure de sodium, indiquée par la croissance, est utilisée pour différencier les entérocoques des non-entérocoques.
Bacitracine (BAC)	La sensibilité à la bacitracine, indiquée par la croissance, est caractéristique de l'espèce <i>Streptococcus pyogenes</i> .
Pyruvate (PRV)	L'utilisation du pyruvate entraîne la formation d'acide. La diminution de pH consécutive est détectée par le rouge de phénol qui vire au jaune.
$\beta$ -lactamase (BL)	La présence de $\beta$ -lactamase est détectée par l'addition de pénicilline et d'iode dans la cupule. La coupure du cycle $\beta$ -lactame entraîne la formation de sites de liaison, plus compétitifs pour l'iode que l'amidon. Si la $\beta$ -lactamase est présente, l'iode se lie au cycle $\beta$ -lactame pour former une réaction incolore. En l'absence de $\beta$ -lactamase, l'iode se combinera avec les molécules d'amidon pour former une coloration bleu-noir.
Hémolyse (HEM)	Les streptolysines S et O produites par les streptocoques provoquent sur gélose au sang une lyse complète ou partielle des globules rouges.

## ANNEXE 4 : Tests biochimiques et de croissance des galeries d'identification BBL CRYSTAL E/NF (Becton-Dickinson)

Arabinose (ARA), Mannose (MNS), Sucrose (SUC), Mélibiose (MEL), Rhamnose (RHA), Sorbitol (SOR), Mannitol (MNT), Adonitol (ADO), Galactose (GAL), Inositol (INO)	Le métabolisme des sucres entraîne une baisse du pH, ce qui fait virer l'indicateur coloré (rouge de phénol)
p-nitrophényl phosphate (PHO) p-nitrophényl $\alpha$ - $\beta$ -glucoside (BGL) p-nitrophényl $\beta$ -galactoside (NPG) p-nitrophényl bis-phosphate (BPH) p-nitrophényl xyloside (BXY) p-nitrophényl $\alpha$ -arabinoside (AAR) p-nitrophényl phosphorylcholine (PHC) p-nitrophényl - $\beta$ -glucuronide (GLR) p-nitrophényl-N-acétyl glucosaminide (NAG)	L'hydrolyse enzymatique des substrats glycoside ou ester de phosphate incolores, substitués par un radical aryle, libère du p-nitrophénol coloré en jaune.
Nitroanidine proline (PRO) $\gamma$ -L-glutamyl p-nitroanidine (GGL)	L'hydrolyse enzymatique du substrat amide incolore libère de la p-nitroaniline colorée en jaune.
Esculine (ESC)	L'hydrolyse de l'esculine, en présence d'ions ferriques, entraîne l'apparition d'un précipité noir.
p-nitro-DL-phénylalanine (PHE)	La désamination oxydative de la phénylalanine entraîne en présence d'ions ferriques une coloration brune
Urée (URE)	L'hydrolyse de l'urée entraîne l'apparition d'ammoniaque et modifie la coloration de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol).
Glycine (GLY)	La dégradation de la glycine entraîne l'apparition de métabolites alcalins qui modifient la coloration de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol).
Citrate (CIT)	L'utilisation du citrate entraîne l'apparition de métabolites alcalins qui modifient la coloration de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol).
Malonate (MAL)	La consommation de malonate entraîne l'apparition de métabolites alcalins qui modifient la coloration de l'indicateur de pH (bleu de bromothymol).
Tétrazolium (TTC)	La réduction du composé tétrazolium entraîne la formation d'un formazan rouge.
Arginine (ARG), Lysine (LYS)	Le catabolisme anaérobie augmente le pH et modifie la coloration de l'indicateur coloré (bromocrésol pourpre).

**ANNEXE 5 : Tests biochimiques et de croissance des galeries  
d'identification API 20NE (bioMérieux)**

Substrats	Réactions/Enzymes	Résultats	
		Négatifs	Positifs
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	Réduction des nitrates en nitrites	Incolore	Rose-rouge
	Réduction des nitrates en azote	Rose	Incolore
Tryptophane (TRP)	Formation d'indole	Incolore Vert pâle - jaune	Rose
Glucose (GLU)	Fermentation	Bleu à vert	Jaune
Arginine (ADH)	Arginine dihydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
Urée (URE)	Uréase	Jaune	Orange/rose/rouge
Esculine		Jaune	Gris/marron/noir
Gélatine à l'encre de chine (GEL)		Pas de diffusion du pigment	Diffusion du pigment NOIR
p-nitro-phényl-βD-galactopyranoside (PNPG)		Incolore	Jaune
Glucose (GLU), Arabinose (ARA), Mannose (MNE), Mannitol (MAN), N-acétyl-glucosamine (NAG), Maltose (MAL), Gluconate (GNT), Caprate (CAP), Adipate (ADI), Malate (MLT), Citrate (CIT), Phényl-acétate (PAC)		Transparence	Trouble
Tétraméthyl-p-phénylène diamine (ox)	Cytochrome oxydase	Incolore	Violet

## ANNEXE 6 : Tests biochimiques et de croissance des galeries d'identification RapID NF Plus (Innovative System)

	<b>Positif</b>	<b>Négatif</b>	<b>Commentaires</b>
Arginine (ADH)	Rouge	Jaune/Orange	Seul le développement de rouge est considéré comme positif
Thiol aliphatique (TRD)	Jaune ou jaune/orange	Rouge ou orange	Seul le développement de jaune ou jaune/orange est considéré comme positif. Une couche jaunâtre peut se former en surface. Agiter la galerie légèrement pour mélanger et enregistrer la couleur.
Triglycéride (EST)	Jaune ou orange clair	Rouge ou orange foncé	seul le développement de jaune ou jaune/orange est considéré comme positif. Une couche rouge peut se former en surface. Agiter la galerie légèrement pour mélanger et enregistrer la couleur.
p-nitrophényl-phosphoester(PHS) p-nitrophényl-N-acétyl-b,D-glucosamide(NAG) p-nitrophényl-a,D-glucoside(aGLU) p-nitrophényl-b,D-glucoside (bGLU) p-nitrophényl-b,D-galactoside(ONPG)	Jaune	Incolore ou jaune très clair	Tout développement de jaune est positif.
Urée (URE)	Rouge	Jaune, jaune/orange ou orange	Seul le développement d'une couleur rouge distincte est considéré comme positif
Glucose (GLU)	Jaune	Bleu, bleu/vert ou vert	Seul le développement d'une couleur jaune distincte est considéré comme positif. Le vert traduit une oxydation et le bleu une alcalinisation. Enregistrer cette couleur pour une identification ultérieure si nécessaire

Après addition des réactifs, laisser la couleur se développer au moins 30 secondes, mais pas plus de 3 minutes. Un développement trop long peut entraîner des faux positifs.



Prolyl-B-naphtylamine (PRO) Pyrrolidonyl-B-naphtylamine (PYR) $\gamma$ -Glutamyl-B-naphtylamine (GGT) Tryptophane-B-naphtylamine (TRY) N-Benzyl-arginine-B-naphtylamine (BANA)	Violet, rouge, orange ou rose foncé	Incolore, orange clair ou rose très pâle	Seul un développement de couleur est considéré comme positif. Un reflet de couleur est considéré comme négatif
Tryptophane (IND)	Brun ou noir	Orange ou rouge	Toute couleur brun-noir est positive. Toute autre couleur est négative.
Nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ )	Rouge ou orange	Incolore ou jaune	Toute couleur rouge/orange est positive.

**ANNEXE 7 : Tests biochimiques et de croissance des galeries  
d'identification Microscan Neg Combo Type 4I et Microscan Neg/Urine  
Combo Type 5I (Dade Behring S.A.) pour bactéries à Gram négatif.**

<b>Réactifs et Caractères d'identification</b>	
Glucose (GLU), Sucrose (SUC), Sorbitol (SOR), Raffinose (RAF), Rhamnose (RHA), Arabinose (ARA), Inositol (INO), Adonitol (ADO), Mélobiose (MEL)	La fermentation d'un carbohydrate spécifique entraîne la formation d'acide. La diminution de pH consécutive est détectée par le rouge de phénol qui vire au jaune.
Urée (URE)	L'uréase coupe l'urée en libérant de l'ammoniaque. L'augmentation du pH qui en résulte est détectée par le rouge de phénol.
Hydrogène Sulfuré (H <sub>2</sub> S)	L'hydrogène sulfuré est produit à partir de thiosulfate de sodium et réagit avec les ions ferriques pour former un précipité noir.
Indole (IND)	Le tryptophane est métabolisé avec formation d'indole, lequel est détecté par le réactif de Kovacs. Si l'indole est présent une coloration rouge se développe.
Lysine (LYS), Arginine (ARG), Ornithine (ORN)	La décarboxylation de ces amino-acides est mise en évidence par la formation d'amines basiques, lesquelles sont détectées par un indicateur coloré, le pourpre de bromocrésol.
Tryptophane Déaminase	La bactérie capable de désaminer le tryptophane produit de l'acide indolepyruvique, qui réagit avec le citrate d'ammonium ferrique présent dans le milieu et avec le chlorure ferrique pour former une coloration brune.
Hydrolyse de l'esculine (ESC)	L'hydrolyse de l'esculine est détectée par le citrate d'ammonium ferrique présent dans le milieu, lequel réagit avec les produits de dégradation pour former un précipité noir.
Voges-Proskauer (VP)	L'acétone, produite à partir du pyruvate, est mise en évidence par le formation d'une coloration rouge, après addition d'hydroxyde de potassium et d'alpha-naphtol.
Galactosidase	la $\beta$ -galactosidase hydrolyse l'ortho-phényl- $\beta$ -D-galactopyranoside en libérant de l'ortho-nitrophénol de couleur jaune.
Citrate (CIT), Malonate, Acétamide, Tartrate	L'utilisation de ces substrats comme seule source de carbone est mise en évidence par une augmentation du pH, détectée par le bleu de bromothymol.
Oxydation/Fermentation (OF/G et OF/B)	L'oxydation du glucose entraîne la formation d'acide. La baisse de pH consécutive est détectée par le bleu de bromothymol. Pour déterminer la production d'un acide, on compare OF/G au témoin négatif OF/B.

Nitrate (NIT)	La réduction du nitrate en nitrite est détectée par l'apparition d'une couleur rouge après addition d'acide sulfanilique et de N,N-diméthylalphanaphtylamine.
Cetrimide	La tolérance au cétrimide est mise en évidence par la croissance en milieu Mueller-Hinton additionné de cétrimide.

## ANNEXE 8 : Caractères des souches constituant le consortium PT

BBL Crystal E/NF	PTA	PTB	PTC	PTD	PTF2	PTEb	PTEt	PTF1	PTG3	PTJ
Gram	-	-	-	-	-	-		-		-
ARA	+									
MNS	+	+								
SUC	+									
MEL										
RHA	+									
SOR	+									
MNT										
ADO										
GAL	+	+								
INO	+									
PHO	+	+		+/-	+	+	+	+		
BGL	+									
NPG	+									
PRO		+	+		+					+
BPH	+	+	+		+			+		+
BXY	+							+		
AAR	+									
PHC	+									
GLR										
NAG	+									
GGL	+	+	+		+			+		+
ESC	+									
PHE		+	+		+					+
URE	+	+	+		+			+		
GLY	+	+	+		+			+		
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLO		+								
TTC	+	+	+		+			+		+
ARG	+	+	+		+			+		+
LYS	+	+	+					+		
Ox	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : positif ; +<sub>f</sub> : positif faible ; +/- : non déterminé ; négatif : case blanche.

API 20NE	PTA	PTB	PTD	PTF2	PTJ	PTF1	MicroScan Pos Combo 4I	PTG1	Rapid NF plus system	PTF1	PTF2	PTG3
NO <sub>3</sub>	+		+		+		CV		ADH			
TRP							Nov		TRD			
GLU	+						VP	+	EST			
ADH	+	+					BE		PHS	+	+	+
URE							PGt		NAG	+/-	+	
ESC	+						MS	+	aGLU			
GEL							PGr		bGLU			
PNPG	+						Opt	+	ONPG			
GLU	+ <sub>f</sub>	+					Pyr		URE			
ARA	+	+					Ure	+	GLU			
MNE	+	+					Tre		PRO		+	
MAN	+						Nit	+	PYR	+	+	
NAG	+						Idx		GGT			
MAL	+						Pho	+	TRY		+	+
GNT	+	+			+		Arg		BANA			
CAP		+					Raf		IND			
ADI			+	+	+	+	Mns		NO3			+
MLT	+	+	+	+	+	+	Lac		OXI	+ <sub>f</sub>	+	+
CIT	+	+	+ <sub>f</sub>	+	+	+						
PAC	+	+		+	+	+						
Ox	-	+	+	+	+	+						

## ANNEXE 9 : Caractères des souches constituant le consortium AT

BBL Crystal E/NF	ATA	ATB	ATF	ATG	ATC	ATE	ATJ	ATH	API 20NE	ATB	ATC	ATE	ATJ	ATH
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-						
ARA								+	NO <sub>3</sub>					+
MNS			+	+				+	TRP					
SUC								+	GLU			+		+
MEL									ADH			+		+
RHA		+					+	+	URE					
SOR								+	ESC			+		+
MNT									GEL				+	
ADO									PNPG			+		+
GAL			+	+				+	GLU			+		+
INO								+	ARA				+	+
PHO		+	+		+	+	+	+	MNE					+
BGL								+	MAN					+
NPG								+	NAG					+
PRO		+	+	+			+	+	MAL					+
BPH	+	+			+	+	+	+	GNT					+
BXY		+					+	+	CAP				+	
AAR								+	ADI		+f	+		
PHC			+						MLT			+		+
GLR									CIT					+
NAG				+				+	PAC					+
GGL	+	+	+	+	+	+	+	+	Ox	+	+	+	+	-
ESC								+						
PHE														
URE	+/-	+	+	+			+	+						
GLY	+	+	+	+			+							
CIT			+	+				+						
MLO			+	+										
TTC		+	+	+	+	+	+	+						
ARG		+	+	+			+	+						
LYS			+	+			+	+						
Ox	+	+	+	+	+	+	+	-						
Cat	+	-	+	+	+	+	-	+						

+ : positif ; +<sub>f</sub> : positif faible ; +/- : non déterminé ; négatif : case blanche.

Rapid NF plus system	ATB	ATC	ATE	ATJ	MicroScan Neg/urine combo type 5I	ATH, PTA, PYI	MicroScan Pos combo type 4I	ATD
ADH					Glu	+		+
TRD		+	+	+	Raf	+	CV	
EST	+	+	+	+	Ino	+	Nov	
PHS	+	+	+	+	Ure		VP	
NAG	+				Lys		BE	
aGLU					Tda		PGt	
bGLU					Cit	+	MS	
ONPG					Cl	+	PGr	
URE			+		Suc	+	Opt	+
GLU	vert	vert	bleu	vert	Rha	+	Pyr	
PRO	+		+		Ado		Ure	
PYR	+	+	+	+	H2S		Tre	
GGT	+	+	+	+	Arg	+	Nit	+
TRY	+		+		Esc	+	Idx	
BANA				+	Mal		Pho	
IND					Cf	+	Arg	
NO3					Sor	+	Raf	
Ox	+	+	+	+	Ara	+	Mns	
					Mel	+	Lac	
					Ind			
					Orn	+		
					VP	+		
					ONPG	+		
					Ox	-		
					Cat	+		

## ANNEXE 10 : Caractères des souches constituant le consortium FT

BBL E/NF	FTA	FTF	FTG	FTB	FTK	FTC	FTI	FTJ	API 20NE	FTA	FTB	FTK	FTI	Baxter+	FTM
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-							+
ARA									NO <sub>3</sub>			+	+	CV	
MNS				+		+			TRP					Nov	+
SUC									GLU					VP	+
MEL									ADH		+	+		BE	
RHA									URE	+				PGt	+
SOR									ESC	+				MS	+
MNT									GEL					PGr	
ADO									PNP G	+				Opt	+
GAL				+		+			GLU	+	+	+		Pyr	+
INO									ARA		+/-			Ure	+
PHO	+	+	+	+	+	+		+	MNE	+	+			Tre	+
BGL	+							+	MAN					Nit	
NPG	+							+	NAG	+		+f		Idx	
PRO		+	+	+	+	+	+	+	MAL	+				Pho	
BPH	+	+	+				+/-	+	GNT		+	+	+	Arg	
BXY	+	+	+					+	CAP		+	+	+	Raf	
AAR									ADI			+	+	Mns	
PHC	+	+	+		+/-	+			MLT		+	+	+	Lac	+
GLR	+								CIT		+	+	+	Cat	-
NAG	+							+	PAC		+	+	+		
GGL	+	+	+	+	+	+	+	+	Ox	+	+	+	+		
ESC	+							+							
PHE								+							
URE	+	+	+	+	+	+	+	+							
GLY		+	+	+		+	+	+							
CIT		+	+	+	+	+	+	+							
MLO				+	+	+									
TTC	+			+	+	+/-	+								
ARG	+	+	+	+	+	+	+	+							
LYS	+		+	+	+	+	+	+							
Ox	+	+	+	+	+	+	+	+ <sub>f</sub>							
Cat	+	-	-	+	+	+	+	+							

+ : positif ; +<sub>f</sub> : positif faible ; +/- : non déterminé ; négatif : case blanche.



## ANNEXE 11 : Caractères des souches constituant le consortium PY

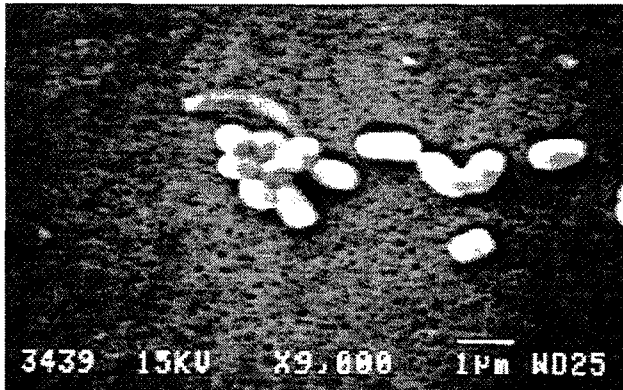
BBL crystal E/NF	A	B	D1	G	J	D3	M	C	D2	H	E	I	F	N	I	O
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA				+				+							+	
MNS		+	+	+	+	+									+	
SUC								+/-							+	+
MEL																
RHA								+							+	+
SOR															+	
MNT																
ADO																
GAL		+	+	+	+	+		+							+	+
INO					+									+	+	
PHO	+	+	+/-	+				+		+	+	+	+		+/-	+
BGL								+			+				+	+
NPG					+			+			+				+	+
PRO	+	+	+	+		+	+		+	+/-	+		+			
BPH			+/-					+	+	+/-	+		+		+	+
BXY								+			+				+	+
AAR															+	
PHC	+			+				+/-								+
GLR								+/-								+
NAG		+	+			+					+				+	
GGL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
ESC	+							+			+				+	+
PHE									+							
URE	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	
GLY	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+			
CIT	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
MLO	+	+	+	+	+	+					+					
TTC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
ARG	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+
LYS	+	+	+	+	+	+	+		+	+/-	+	+	+		+	+
Ox	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<sup>+</sup> <sub>lent</sub>	<sup>+</sup> <sub>1</sub>	+	+	-
Cat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<sup>+</sup> <sub>f</sub>	+	+	+

+: positif ; <sup>+</sup><sub>f</sub>: positif faible ; +/- : non déterminé ; négatif : case blanche.

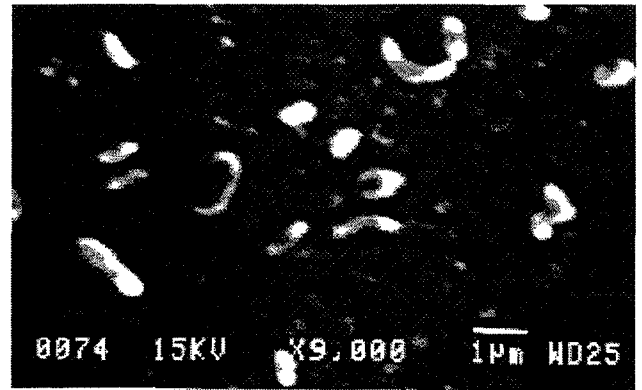
API 20NE	PYB	PYF	PYN	PYD2	PYH	PYD3	PYM	PYO	MicroScan Pos combo type 4I	PYL	MicroScan Neg/Urine combo type 5I	PYO
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-		+		-
NO3	+		+	+			+	+	CV		Glu	+
TRP									Nov		Raf	
GLU				bleu		vert			VP	+	Ino	
ADH						+	+		BE		Ure	
URE	+/-					+	+		PGt		Lys	
ESC								+	MS	+	Tda	
GEL									PGr		Cit	
PNPG								+	Opt	+	Cl	
GLU	+					+	+	+	Pyr		Suc	
ARA	+					+		+	Ure		Rha	
MNE	+					+			Tre		Ado	
MAN									Nit	+	H2S	
NAG								+	Idx		Esc	+
MAL								+	Pho		Mal	
GNT	+			+		+	+	+	Arg	+	Cf	+
CAP	+					+	+	+	Raf		Sor	
ADI		+	+	+	+		+		Mns		Ara	
MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	Lac		Mel	
CIT	+	+	+	+	+	+	+	+	Ox	-	Ind	
PAC	+	+		+	+	+	+	+	Cat	+	Orn	
Ox	+	+	+	+	+	+	+	+			VP	
											ONPG	
											Ox	+

Rapid NF plus system	PYH	PYN	PYM	PYO
ADH et URE				
TRD	+	+	+	+
EST		+		+
PHS	+	+	+	+
NAG	+ <sub>f</sub>		+ <sub>f</sub>	+
aGLU		+		+
BGLU et ONPG				+
GLU	bleu	bleu	bleu	vert
PRO	+		+	
PYR	+		+	
GGT			+	+
TRY	+	+	(+)	+
BANA				+ <sub>f</sub>
IND		+	+	
NO3		+	+	+

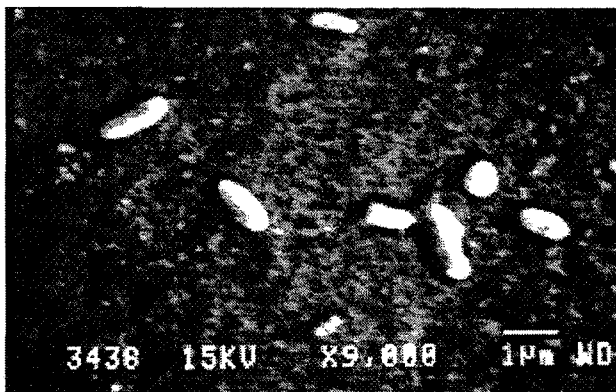
**ANNEXE 12 : Photographies en microscopie électronique à balayage du consortium AT après croissance sur différents HAP comme seule source de carbone**



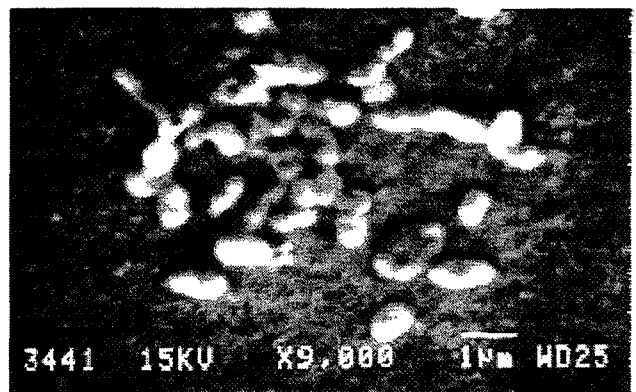
**Source de carbone : Anthracène**



**Source de carbone : phénanthrène**

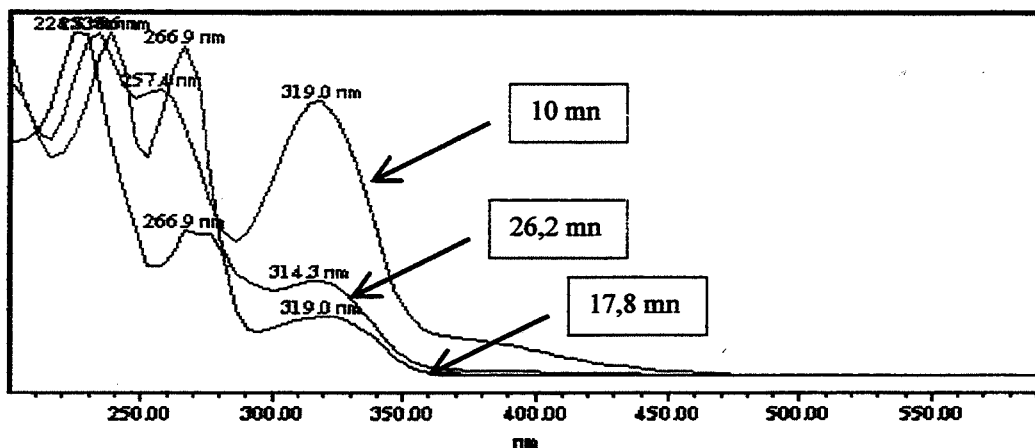


**Source de carbone : fluoranthène**

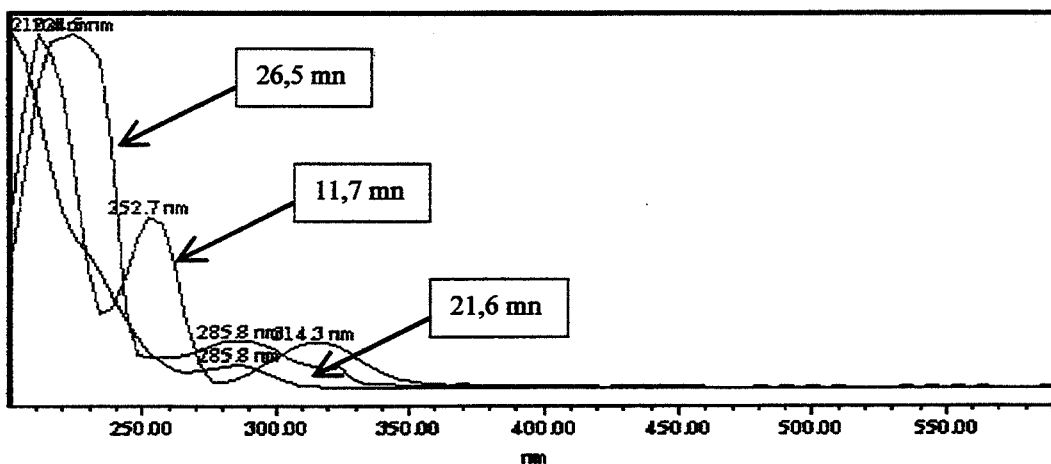


**Source de carbone : pyrène**

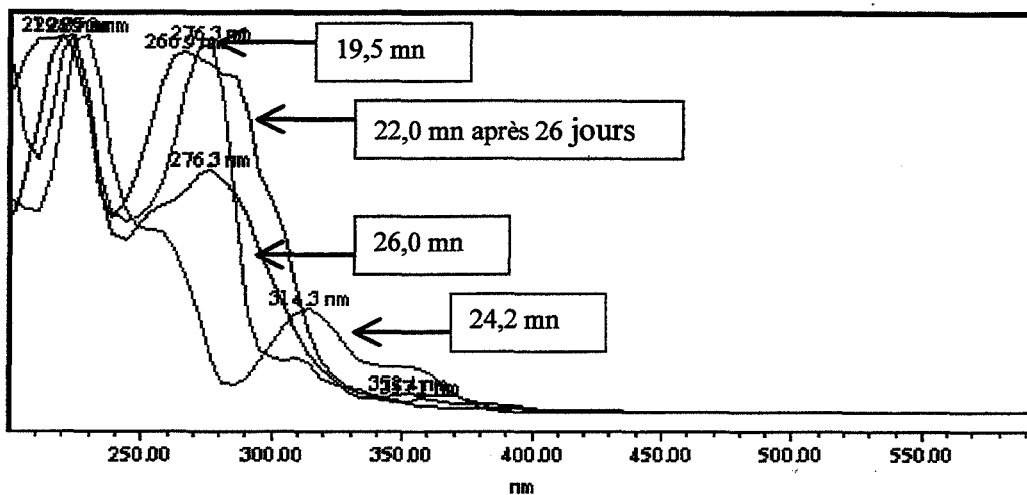
**ANNEXE 13 : Spectres (normalisés) d'absorption UV-visible entre 200 nm et 600 nm des produits du métabolisme du fluoranthène, du phénanthrène, du pyrène, de l'antracène et du fluorène par les consortia FT, PT, PY et AT.**



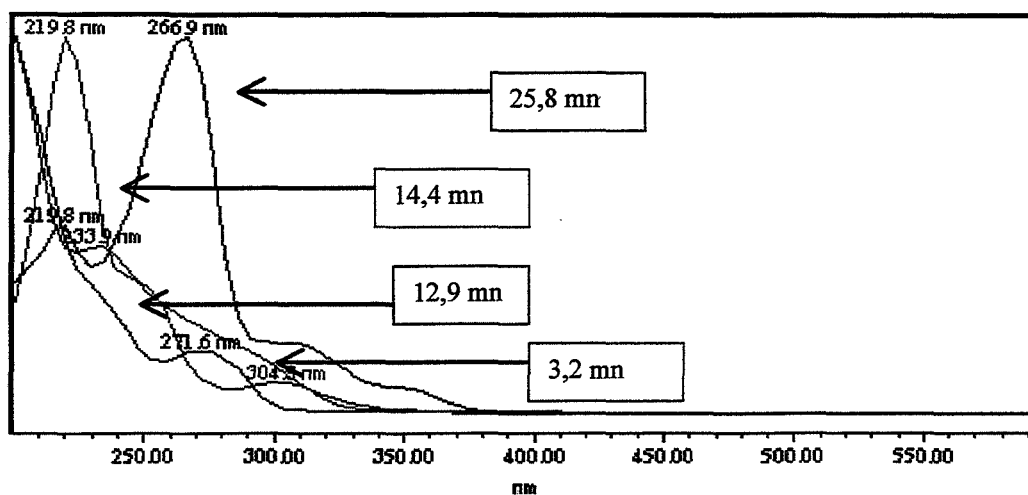
**Produits de dégradation du fluoranthène de temps de rétention 10,0mn, 17,8mn et 26,2mn (protocole au IV.3.2.3).**



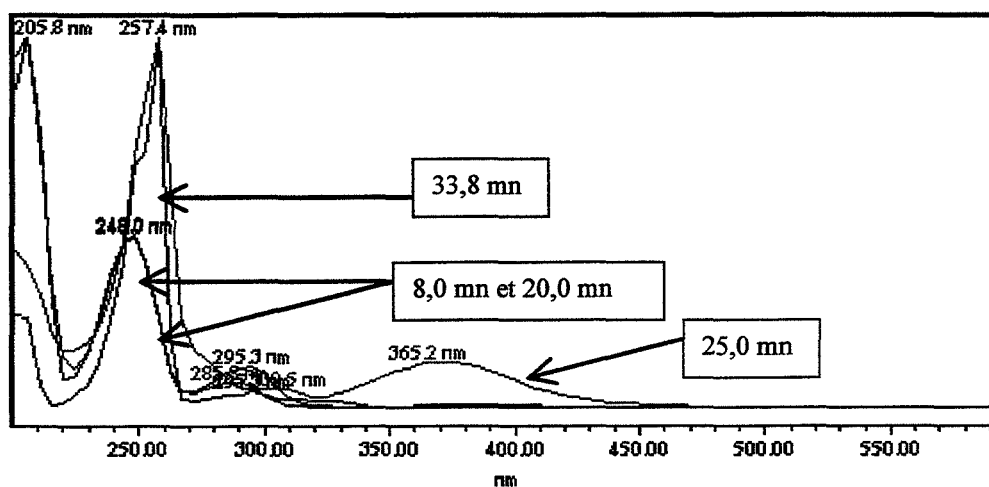
**Produits de dégradation du phénanthrène de temps de rétention 11,7 mn, 21,6 mn et 26,5 mn (protocole au IV.3.2.3).**



Produits de dégradation du pyrène de temps de rétention 19,5 mn, 22,0 mn, 24,2 mn et 26,0 mn (protocole au IV.3.2.3).



Produits de dégradation de l'anthracène de temps de rétention 3,2 mn, 12,9 mn, 14,4 mn et 25,8 mn (protocole au IV.3.2.3).



Produits de dégradation du fluorène de temps de rétention 8,0 mn, 20,0mn, 25,0mn et 33,8 mn (protocole au IV.3.2.3).



n° d'ordre : 188 CD

NOM : Christine BIDAUD

SUJET : Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - Approche Microbiologique et Application au Traitement d'un Sol Pollué

SPECIALITE : Génie des Procédés

MOTS CLES : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques – Sol – Biodégradation – Pollution – Microbiologie

RESUME :

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules qui posent un grave problème environnemental à cause de leurs propriétés toxiques, cancérigènes, voire tératogènes. Les sites d'anciennes usines à gaz sont souvent pollués par ces produits issus de la combustion incomplète de matières organiques. Notre travail a été réalisé à partir d'échantillons de sol issus d'un site d'ancienne usine à gaz.

Nous avons d'abord étudié la biodégradabilité naturelle des 16 HAP ciblés par l'U.S. E.P.A. à partir d'échantillons de sol prélevés sur le site. Pour cela, nous avons étudié leur biodégradabilité pour différents paramètres environnementaux : humidité, pH, aération (par addition ou non de sciure) et température. Nous avons ainsi mis en évidence une biodégradation naturelle pouvant atteindre 90% pour les HAP de 2 à 4 cycles, alors que les HAP de 5 et 6 cycles sont peu ou pas biodégradés. Les variations des différents paramètres environnementaux ont une influence sur la cinétique de dégradation des HAP étudiés, mais pas sur les teneurs finales.

Nous avons également procédé à la sélection de micro-organismes, issus du sol pollué échantillonné, capables de croître sur différents HAP de 3 et 4 cycles (fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène et pyrène) comme seule source de carbone. Quatre consortia de micro-organismes se sont révélés intéressants pour leur versatilité d'utilisation des HAP et leurs capacités de dégradation. Les souches impliquées dans ces consortia ont été identifiées par des méthodes classiques de microbiologie. Leur croissance sur les HAP (cristaux) semble limitée par des phénomènes de transfert vers la phase aqueuse. L'addition de surfactant pour augmenter la disponibilité des HAP dans le milieu a des effets variés et contradictoires en fonction des HAP et des consortia. Des métabolites, non identifiés, de la dégradation des HAP par les micro-organismes ont été mis en évidence dans les surnageants de culture.

Nous avons ensuite étudié la dégradation des 16 HAP cibles dans des microcosmes de sol pollué inoculés avec les consortia sélectionnés. Les premiers essais ont été réalisés sur un sol stérilisé par autoclavage dans le but d'évaluer les capacités propres des 4 consortia à dégrader des HAP dans une matrice complexe. Seule la dégradation des HAP de 3 et 4 cycles a pu ainsi être mise en évidence. Les essais suivants ont été réalisés dans des microcosmes de sol non stérile (naturel) inoculés avec 2 consortia dans le but d'évaluer leur comportement dans un environnement déjà peuplé de micro-organismes et leurs performances en inoculation d'un sol réel. Ils accélèrent le processus de biodégradation, mais ne réduisent pas les teneurs finales en HAP.