

# Devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements

*Identification des composés « métabolites » et des cinétiques*



C4H5O2_5	2/ 9/99	THERMC	4H	50	2	OG	300.000	5000.000	1392.000	1
1.64121890E+01	1.20184883E-02	-4.40468566E-06	7.30124728E-10	-4.42784365E-14						2

**ETAT DES CONNAISSANCES SUR LE DEVENIR  
DE POLLUANTS ORGANIQUES DANS LES SOLS  
LORS DE LA BIODEGRADATION NATURELLE  
ET APRES BIOTRAITEMENTS :**

**IDENTIFICATION DES COMPOSES « METABOLITES »  
ET DES CINETIQUES**

**RAPPORT FINAL**

**mars 2007**

**M.-J. JOURDAIN, A.-M. CHARISSOU - IRH ENVIRONNEMENT - Service Impact  
sur les Milieux**

Créée en 1989 à l'initiative du Ministère en charge de l'Environnement, l'association RECORD – REseau COopératif de Recherche sur les Déchets et l'Environnement – est le fruit d'une triple coopération entre industriels, pouvoirs publics et chercheurs. L'objectif principal de RECORD est le financement et la réalisation d'études et de recherches dans le domaine des déchets et des pollutions industrielles.

Les membres de ce réseau (groupes industriels et organismes publics) définissent collégalement des programmes d'études et de recherche adaptés à leurs besoins. Ces programmes sont ensuite confiés à des laboratoires publics ou privés.

**Avertissement :**

Les rapports ont été établis au vu des données scientifiques et techniques et d'un cadre réglementaire et normatif en vigueur à la date de l'édition des documents.

Ces documents comprennent des propositions ou des recommandations qui n'engagent que leurs auteurs. Sauf mention contraire, ils n'ont pas vocation à représenter l'avis des membres de RECORD.

- ✓ Pour toute reprise d'informations contenues dans ce document, l'utilisateur aura l'obligation de citer le rapport sous la référence :

**RECORD.** Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des cinétiques, 2007, 148 p, n°05-0513/1A

- ✓ Ces travaux ont reçu le soutien de l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie)  
[www.ademe.fr](http://www.ademe.fr)

© RECORD, 2007

## Résumé

Les pollutions anciennes ou récentes des sols par des composés organiques « naturellement » dégradables engendrent des composés métabolites plus ou moins stables dans le temps. Or, ces composés peuvent parfois soit être moins dangereux soit plus dangereux et/ou mobiles que les polluants initiaux.

L'objectif de l'étude est de réaliser un état des connaissances bibliographique, basé sur les études et les bases de données existantes dans le domaine, en vue de fournir des informations pertinentes sur les composés métabolites intermédiaires et finaux, sur les cinétiques de biodégradation naturelle et les facteurs influençants, de trois familles de polluants organiques couramment rencontrées sur les sites pollués (alcanes, hydrocarbures aromatiques polycycliques et solvants chlorés).

La première étape recueille les rapports et publications concernant le sujet à l'aide des bases de données bibliographiques et des moteurs de recherche disponibles. Les propriétés physico-chimiques et les données (éco)toxiques sont indiquées pour les principales molécules de chaque famille (molécules mères) et sont rappelées dans les tableaux de synthèse.

Puis, un récapitulatif bibliographique des voies de biodégradation aérobie et anaérobie est proposé pour chacune des familles organiques. Les paramètres environnementaux influençant les réactions et les conditions opératoires des essais issus de la littérature sont également précisés.

Enfin, les principaux métabolites sont indiqués ainsi que leurs propriétés physico-chimiques et (éco)toxiques afin de pouvoir comparer la toxicité des molécules parents et des produits de biotransformation.

Les références bibliographiques citées dans le document ont été classées en fonction des familles chimiques en fin de chaque sous-partie concernée.

En annexes, des fiches de synthèse classées ont été réalisées rappelant les voies de dégradation avec indication des conditions aérobies et anaérobies ainsi que des micro-organismes concernés. Les fiches complètes avec des liens hypertextes sont jointes au rapport sous format informatique.

*Mots clé : Voies de biodégradation ; Composés organiques ; Métabolites ; Sol ; toxicité*

## Summary

This project aims at documenting the importance of the processes implied in the treatment of the polluted sites and soils by more specifically targeting the influencing factors and the metabolites resulting from the biodegradation for 3 families of organic compounds:

- Alkanes
- Polycyclic aromatic hydrocarbons
- Chlorinated solvents.

Indeed, the metabolisation products resulting from the means of fight set up by the man (biotreatments) or natural processes (natural attenuation), can, under certain conditions, to generate a hazard for the environment and human health.

The biodegradation term simply means the biological transformation of an organic compound into another form. This process can thus convert an inoffensive compound into toxic compound, change a substance immediately biodegradable into persistent substance or modify the toxicity of the compound. The natural biodegradation is a nonintrusive process whose use can be considered at the time of the contaminated sites remediation. People speak then about natural attenuation (or passive remediation). Man also set up methods of biological treatment using the enzymatic natural activities of microorganisms to transform, degrade, fix or immobilize pollutants met in various ecosystems (water, grounds, waste...). These two ways made it possible to consider "biotreatment" of polluted sites and soils.

This study is thus registered like a state of art in the degradation ways of organic molecules targeted in soils and of the specific microorganisms implication for the transformation and the result in metabolites.

*Key words: Biodegradation pathways; Organic compounds; Metabolites; Soil; toxicity*

# Sommaire

<b>I. CONTEXTE GENERAL</b>	<b>9</b>
1. Cadre de l'étude	10
2. Objectifs spécifiques de l'étude	11
<b>II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>12</b>
1. Recherche des mots cle	13
2. Sources des données bibliographiques	13
3. Paramètres recherchés	14
4. Présentation de la démarche d'interrogation utilisée	14
5. Réunions avec le comité de pilotage	15
<b>III. RAPPELS SUR LE DEVENIR DANS LES SOLS DES POLLUANTS ORGANIQUES</b>	<b>16</b>
1. Le sol : un système polyphasique	17
2. Processus généraux de biodégradation des composés organiques	17
a. La dégradation primaire	17
b. Les voies métaboliques	18
c. Le cométabolisme	19
3. Références bibliographiques sur le devenir des composés organiques dans les sols	20
<b>IV. ELEMENTS (ECO)TOXICOLOGIQUES RECHERCHES</b>	<b>23</b>
1. Tests de toxicité – rappel des principes	24
2. Descripteurs toxicologiques rencontrés	25
3. Données toxicologiques	25
4. Données écotoxicologiques	27
<b>V. PRINCIPAUX BIOPROCEDES APPLIQUES AUX SOLS POLLUES</b>	<b>28</b>
1. Les procédés de traitement des sols pollués	29
2. La technologie de décontamination (d'après Varillon, 2002)	29
<b>VI. LES ALCANES</b>	<b>31</b>
1. Caractéristiques physico-chimiques	32
2. Caractéristiques (éco)toxiques des alcanes	33
a. Données toxicologiques	33
b. Données écotoxicologiques	34
3. Biodégradation aérobie	34
a. Cas des alcanes linéaires	34
b. Cas des cycloalcanes	37

4. Biodégradation anaérobie	37
5. Etudes de terrain	38
6. (Eco)toxicité des métabolites	38
7. A retenir	42
8. Références bibliographiques sur la biodégradation des alcanes	43
<b>VII. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES</b>	<b>49</b>
1. Caractéristiques physico-chimiques	50
2. Caractéristiques (éco)toxicologiques	52
3. Biodégradation aérobie	54
4. Biodégradation anaérobie bactérienne	61
5. Etude de cas	63
6. Paramètres influençant la biodégradation des HAP	64
7. Production et (Eco)toxicité des métabolites	66
8. A retenir	71
9. Références bibliographiques sur la biodégradation des HAP	73
<b>VIII. LES SOLVANTS CHLORES</b>	<b>83</b>
1. Propriétés physico-chimiques	84
2. Propriétés (éco)toxicologiques et rémanence	84
3. Principaux mécanismes de dégradation des solvants chlorés	86
4. Biodégradation du chlorométhane (CM)	87
5. Biodégradation des éthanes chlorés	88
a. Le trichloroéthane	88
b. Le tétrachloroéthane	89
6. Biodégradation du chlorure de vinyle (CV)	91
7. (Eco)toxicité des métabolites	92
8. A retenir	96
9. Références bibliographiques sur la biodégradation des solvants chlorés	97
<b>IX. RETOURS DE TERRAIN ET EVALUATION DES BIOTRAITEMENTS</b>	<b>102</b>
1. Rôle des biotests dans le suivi sur site	103
2. Exemples choisis	103
3. Références bibliographiques sur les bioprocédés	110

<b>X.</b>	<b>CINETIQUES DE DEGRADATION</b>	<b>111</b>
	1. Généralités	112
	2. Les alcanes	112
	3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	113
	4. Les solvants chlorés	115
	5. Références bibliographiques sur les cinétiques de dégradation	118
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>119</b>
<b>XII.</b>	<b>ANNEXES</b>	<b>126</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. Séquences métaboliques majeures (d'après Baker et Herson, 1994) .....	18
Tableau 2. Niveaux de toxicité aiguë en fonction des valeurs de DL50 (CL50) pour les voies orale, dermale et l'inhalation .....	25
Tableau 3. Niveaux de toxicité aiguë en fonction des valeurs de DL50 (CL50) pour les voies orale, dermale et l'inhalation selon l'UE.....	26
Tableau 4. Catégories de toxicité aiguë en fonction des valeurs de CE50 obtenues lors de tests sur poissons ou invertébrés aquatiques .....	27
Tableau 5. Méthode de calcul des PNEC selon la Communauté européenne.....	27
Tableau 6. Propriétés physiques de quelques alcanes linéaires.....	32
Tableau 7. Toxicité aiguë du n-hexane (INRS, 2005) .....	33
Tableau 8. Toxicité aiguë chez <i>Daphnia magna</i> de certains alcanes (Irwin <i>et al.</i> 1997).....	34
Tableau 9. Produits métaboliques issus de la dégradation des alcanes par <i>Pseudomonas</i> .....	36
Tableau 10. (Eco)toxicité des alcanes et de leurs produits de biodégradation .....	41
Tableau 11. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (d'après INERIS).....	50
Tableau 12. Demi-vies des HAP par biodégradation dans le sol (INERIS, 2005).....	51
Tableau 13. Cancérogénicité des 16 principaux HAP dans Doornaert et Pichard (2003).....	52
Tableau 14. Valeurs d'écotoxicité aquatique de quelques HAPs (données disponibles sur le site de l'INERIS).....	53
Tableau 15. Principales souches bactériennes aérobies participant à la dégradation des HAP.....	56
Tableau 16. Bactéries prédominantes et métabolites produits dans des échantillons de sols pollués (d'après Fritsche et Hofrichter, 2000).....	56
Tableau 17. Récapitulatif des paramètres influençant la biodégradation des HAP .....	65
Tableau 18. Récapitulatif des métabolites recensés pour quelques HAP .....	66
Tableau 19. (Eco)toxicité des HAPs (issus de la liste US-EPA) et de leurs produits de biodégradation .....	70
Tableau 20. Propriétés physico-chimiques de solvants chlorés (www.komex.com/solutions/chlorinatedsolvents.stm) .....	84
Tableau 21. Pathologie – Toxicologie des solvants chlorés (sources : INRS et IARC).....	85
Tableau 22. Ecotoxicité des solvants chlorés (source : Inchem) .....	85
Tableau 23. Exemples de réactions de déchlorination en conditions anaérobies (van Eekert et Schraa, 2001).....	89
Tableau 24. Produits de dégradation du tétrachloroéthane.....	90
Tableau 25. Rappel des propriétés (éco)toxicologiques des solvants chlorés et de leurs principaux métabolites .....	95
Tableau 26. Concentrations en HAP et mutagénicité d'échantillons de sols contaminés (ancienne usine à gaz) avant et après bioremédiation (d'après Alexander <i>et al.</i> , 2002) .....	103
Tableau 27. Toxicité et génotoxicité des échantillons de sols avant et après traitement .....	106
Tableau 28. Résultats des analyses chimiques et écotoxiques avant et après traitement.....	107
Tableau 29. Résultats des analyses chimiques et écotoxiques à T0 et après 8 mois .....	108
Tableau 30. Résumé des principales valeurs moyennes des constantes de vitesse de dégradation des HAP (d'après Aronson <i>et al.</i> , 1999) .....	114
Tableau 31. Valeurs des constantes de demi-vies issues de la littérature (d'après Denys, 2004)....	115
Tableau 32. Valeurs T <sub>c</sub> mesurées pour chaque composé par des cultures mixtes après 4 h d'exposition (d'après Chang et Alvarez-Cohen, 1996).....	117

## Liste des figures

Figure 1. Courbe théorique « Concentration-Réponse »(ADEME, 2002).....	24
Figure 2. Voie de dégradation des alcanes par oxydation terminale, sub- et bi-terminale (d'après Beilen <i>et al.</i> , 2003) .....	35
Figure 3. Schéma récapitulatif de la voie de dégradation aérobie des n-alcanes et sa localisation chez <i>C. maltosa</i> incluant le rôle des P450 dans la cascade d'oxygénation ER :Reticulum endoplasmique ; FAOD : oxydase à acide gras ; ALDH : déshydrogénase à aldéhyde.....	36
Figure 4. Voie métabolique générale du cyclohexane .....	37
Figure 5. Principes généraux de la dégradation aérobie des hydrocarbures : processus associés à la croissance cellulaire (d'après Fritsche et Hofrichter, 2000) .....	55
Figure 6. Oxydation du Naphtalène en cis-1,2-dihydrodiol naphtalène par la naphtalène dioxygénase (ISP = protéine sulfo-ferrique) .....	57
Figure 7. La voie aérobie de dégradation bactérienne de l'antracène par <i>Pseudomonas</i> .....	58
Figure 8. La voie aérobie de dégradation bactérienne du Pyrène par <i>Mycobacterium spp.</i> (d'après Sutherland <i>et al.</i> , 1995) .....	59
Figure 9. Voies de biotransformation des HAP en conditions anaérobies (d'après Karthikeyan et Bhandari, 2001) .....	61
Figure 10. Voie d'oxydation du chlorométhane en acide formique avec CmuA, methyltransferase I; CmuB, methyltransferase II; MetF, putative 5,10-methylene-H <sub>4</sub> folate reductase; FOLD, putative 5,10-methylene-H <sub>4</sub> folate dehydrogenase/5,10-methenyl-H <sub>4</sub> folate cyclohydrolase; PurU, putative 10-formyl-H <sub>4</sub> folate hydrolase.....	87
Figure 11. Transformations abiotique (A) et biotique (B) du TCA en conditions méthanogènes (VC : Vinyl Chloride ; CA : Chloroéthane ; DCE : Dichloroéthylène) d'après RD Norris, 1994 .....	88
Figure 12. Voie de dégradation du 1,1,2,2-TeCA d'après House, 2002 .....	90
Figure 13. Dégradation aérobie intracellulaire du chlorure de vinyle : bénéfique net énergétique pour l'organisme dégradant (d'après <a href="http://www.regeneris.com/ORCtech/Tb2223.htm">www.regeneris.com/ORCtech/Tb2223.htm</a> ).....	91
Figure 14. Dégradation aérobie extracellulaire du chlorure de vinyle : pas de bénéfique énergétique pour l'organisme méthanotrophe produisant les enzymes (d'après <a href="http://www.regeneris.com/ORCtech/Tb2223.htm">www.regeneris.com/ORCtech/Tb2223.htm</a> ) .....	92
Figure 15. Ordres cinétiques de dégradation microbienne .....	112

## Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ALDH : Déshydrogénase aldéhyde  
ASTM : American society for testing and material  
B(a)A : Benzo(a)Anthracène  
B(a)P : Benzo(a)Pyrène  
BCF : Bioconcentration Factor (facteur de bioconcentration)  
BTEX : composés Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene  
CE50 : Concentration Effective 50 %  
CE20 : Concentration Effective 20 %  
CFC : Chlorofluorocarbones  
CM : Chlorométhane  
CIRC : Centre international de Recherche sur le Cancer  
DCE : DiChloroEthane  
EPA : Environmental Protection Agency  
FAOD : Oxydase à acide gras  
g : gramme  
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
IARC : International Agency for Research on Cancer (Agence internationale pour la recherche contre le cancer)  
INERIS : Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques  
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité  
j : jour  
kg : kilogramme  
Kow : Octanol/water partition coefficient (coefficient de répartition octanol/eau)  
l : Litre  
LCPE : Loi canadienne sur la protection de l'environnement  
µg : microgramme  
mg : milligramme  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> : Nitrites  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> : Nitrates  
PCB : Polychlorobiphényles  
PCDD : PolyChloroDibenzo-para-Dioxines  
PCDF : PolyChloroDibenzoFuranes  
PCE : Perchlorure Ethylène  
PEC : Predicted Environmental Concentration (Concentration prévisible dans l'environnement)  
PNEC : Predicted No Effect Concentration (Concentration prévisible sans effet pour l'environnement).  
TCA : Trichloroéthane  
TeCA : Tetrachloroéthane  
US : United States

# **I. CONTEXTE GENERAL**

## 1. Cadre de l'étude

Ce projet vise à documenter l'importance des processus impliqués dans le traitement des sites et sols pollués en ciblant plus spécifiquement :

- les facteurs influençant la biodégradation ;
- les métabolites issus de ces voies de dégradation.

En effet, les produits de métabolisation résultant des moyens de lutte mis en place par l'homme (*biotraitements*) ou de procédés naturels (*atténuation naturelle*), peuvent, sous certaines conditions, générer un risque pour l'environnement et la santé humaine.

Le sol est un système hétérogène et complexe, composé d'une phase solide représentée par les particules du sol, une phase liquide représentée par l'eau du sol et une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol. Les molécules xénobiotiques une fois sorbées aux composantes du sol (telles que la matière organique) peuvent subir des dégradations abiotiques (volatilisation, hydrolyse ou réactions photochimiques) et des transformations biotiques liées aux micro-organismes des sols.

Les composés organiques sont souvent classés comme biodégradables, persistants ou récalcitrants. Le terme biodégradation signifie tout simplement la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme. Ce processus peut donc convertir un composé inoffensif en composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance persistante ou modifier la toxicité du composé.

La biodégradation naturelle est un processus non intrusif dont l'utilisation peut être envisagée lors de la remédiation des sites contaminés. On parle alors d'atténuation naturelle (ou remédiation passive). L'atténuation naturelle comme outil de remédiation a été développée par l'US-EPA (Directive 9200.4-17P, 1999) sous le nom d'« atténuation naturelle contrôlée » (*monitored natural attenuation*) vise à exploiter les mécanismes naturels impliqués dans ce phénomène. L'homme a également mis en place des méthodes de traitement biologique utilisant les activités naturelles enzymatiques des micro-organismes pour transformer, dégrader, fixer ou immobiliser des polluants rencontrés dans différents milieux (eaux, sols, déchets,...). Ces deux voies ont permis d'envisager un « biotraitement » des sites et sols pollués.

**L'objectif de cette étude est de réaliser un état des connaissances sur le devenir des polluants organiques dans les sols contaminés en particulier des trois familles majoritairement rencontrées (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques : HAP ; Solvants chlorés ; Alcanes) et pour lesquelles l'Association RE.CO.R.D. souhaitait réunir des informations. Un recensement des mécanismes de biodégradation, des cinétiques de réactions et des métabolites formés a ainsi été réalisé.**

Le travail présenté s'est attaché à étudier les mécanismes impliqués dans la biodégradation au cours du phénomène d'atténuation naturelle mais également dans les filières existantes de biotraitements. Une typologie des conditions environnementales influençant la génération de métabolites dangereux est également dégagée.

## **2. Objectifs spécifiques de l'étude**

Les objectifs spécifiques de l'étude sont :

1. de réaliser une recherche la plus exhaustive possible des informations disponibles concernant les voies de biodégradation dans les sols des trois familles de polluants sélectionnées ;
2. de collecter les informations du devenir des polluants auprès de banques de données ou de retours de terrain en privilégiant les cinétiques d'apparition et les propriétés (physico-chimiques et (éco)toxiques) des métabolites obtenus ;
3. de réaliser une synthèse claire et complète des informations obtenues sur le devenir des polluants organiques dans les sols en précisant, le cas échéant, l'existence des lacunes bibliographiques relevées.

## **II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Recherche des mots cle

La réalisation de la recherche bibliographique s'est effectuée sans privilégier les retours de travaux de terrain par rapport aux exemples tirés de l'expérimentation en laboratoire, et elle s'est appuyée sur diverses bases de données. Une liste de mots clés a été définie et deux principaux syntagmes ont été déterminés.

**Syntagme 1 : comportement, sol, biodégradation, HAP<sup>1</sup>, métabolites, toxicité**  
(*fate, soil, biodegradation, PAH, metabolites, toxicity*)

**Syntagme 2 : atténuation naturelle, micro-organismes, bioremédiation, hydrocarbures**  
(*natural attenuation, micro-organisms, bioremediation, hydrocarbons*)

Le syntagme 1 correspond aux publications qui traitent plus généralement du comportement des polluants dans les sols et des produits de dégradation sans que l'on s'intéresse à un scénario particulier.

Le syntagme 2 correspond à des publications qui traitent de l'utilisation de techniques de bioremédiation dans le cadre notamment de retour d'expérimentations de terrain.

## 2. Sources des données bibliographiques

- La recherche bibliographique s'est effectuée sur un certain nombre de bases de données et moteurs de recherche classiques pour recueillir le maximum de données générales, notamment :
  - MEDLINE
  - TOXNET
  - webofscience
  - Google/Scholar Google
  - Moteur de recherche Bjorgul
  - Science direct
  - Chemical Abstracts
  - Inchem
  - ...
- D'autres moteurs de recherche plus spécialisés sur les polluants organiques et leurs métabolites ont été consultés, par exemple :
  - [www.iupac.org/publications/](http://www.iupac.org/publications/)
  - [lab.nap.edu/nap.cgi/](http://lab.nap.edu/nap.cgi/)
  - [www.ifp.fr](http://www.ifp.fr)
- Des ouvrages plus spécialisés dans les techniques de bioremédiation ont été également consultés :

<sup>1</sup> Ou alcanes ou solvants chlorés, ici l'exemple est montré avec les HAP

- Siegrist, R.L., M.A. Urynowicz, O.R. West, M.L. Crimi, and K.S. Lowe (2001). Principles and Practices of *In situ* Chemical Oxidation Using Permanganate. Battelle Press, 505 King Avenue, Columbus, Ohio, 336 pp.
- Cookson, J.R., Jr. Bioremediation engineering-Design and application. 1995. McGraw-Hill, Inc., New York, 524 pp.
- Leeson, A. and R. Hinchee. 1997. Soil Bioventing Principles and Practices. CRC Press Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 244 pp.
- Norris, R.D., Hinchee, R.E., Brown, R., McCarty, P.L., Semprini, L., Wilson, J.T., *et al.* (1994) Handbook of Bioremediation. (eds). Boca Raton, FL, USA: Lewis Publishers, 272 pp.
- Baker K.H. and Herson D.S. (1994), Bioremediation, McGraw-Hill, Inc., New York, 375 pp.
- Fritsche, W. and Hofrichter, M. (2000) Aerobic degradation by microorganisms, in Biotechnology, Rehm, H.J. and Reed, G. (eds.), 11b, Environmental Processes II, Wiley-VCH, Weinheim, 146-164 pp.

### **3. Paramètres recherchés**

L'analyse de la bibliographie a porté sur la recherche d'articles concernant, dans la mesure du possible, un certain nombre d'informations telles que :

- les concentrations en polluants avant et après traitement (naturel ou artificiel),
- les microorganismes impliqués et les durées de dégradation en fonction des molécules,
- les conditions expérimentales (durée, température, pH, rH, concentration en nutriments, concentration en oxygène, humidité, matières organiques...),
- les voies de biodégradation aérobie ou anaérobie ainsi que les cinétiques observées,
- les métabolites intermédiaires et finaux engendrés ainsi que la persistance de ces composés,
- la toxicité des molécules mères et des métabolites et leurs impacts potentiels sur la santé humaine et l'environnement.

### **4. Présentation de la démarche d'interrogation utilisée**

L'interrogation de moteurs de recherche et des sites spécialisés a été utile pour la recherche de références bibliographiques telles que des comptes rendus de conférences, des extraits de livres ou des revues nationales. Les documents non disponibles en ligne ont été commandés (*via* l'INIST).

La réunion des différents documents recherchés sur les banques de données a permis de réaliser une liste bibliographique pour chaque famille de composé : celle ci a été placée à chaque fin de chapitre et couvre 50 années de recherche en biodégradation des composés organiques. Ces références, dans la plupart des cas, sont accompagnées des résumés des publications.

Il a été nécessaire d'effectuer un tri afin d'éliminer les « faux-positifs » ayant trop peu d'intérêt par rapport au sujet. Pour ce faire, les critères de sélection des articles ont été les suivants :

- rejet des publications n'ayant aucune relation avec le sujet :
  - o ne pas utiliser les travaux sur le compartiment aquatique pour les exemples *in situ* ou en laboratoire,
- cibler les 3 familles de molécules retenues par *RE.CO.R.D.*,
- non-rejet des *reviews*,
- recherche des travaux décrivant les conditions expérimentales lors de la biodégradation.

## **5. Réunions avec le comité de pilotage**

Un comité de pilotage a suivi le déroulement de l'étude et a permis la structuration du présent rapport dans le cadre de diverses réunions intermédiaires.

Chaque chapitre consacré à une des 3 familles de composés organiques (alcanes, HAP et solvants chlorés) se décompose en 4 parties distinctes :

- les propriétés physico-chimiques et (éco)toxiques des molécule-parents,
- les voies de dégradation (aérobie et anaérobie),
- les retours de terrain,
- les propriétés physico-chimiques et (éco)toxiques des métabolites sous format de tableaux de synthèse,
- des conclusions sous format de partie « A RETENIR »

# **III. RAPPELS SUR LE DEVENIR DANS LES SOLS DES POLLUANTS ORGANIQUES**

## **1. Le sol : un système polyphasique**

Le sol peut être défini comme la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air et d'organismes.

Le sol est donc un système hétérogène et complexe. Il est composé d'une phase solide représentée par les particules du sol, une phase liquide représentée par l'eau du sol (qui peut être enrichie en de nombreux composés et particules) et une phase gazeuse constituée par l'air emprisonné dans le sol. Ceci permet de déterminer un domaine non saturé et un domaine saturé. La zone non saturée constitue une interface entre l'atmosphère et l'hydrosphère. Dans cette partie, les pores du sol ne sont que partiellement remplis par l'eau et le gaz y prédomine. La zone saturée est une zone où l'ensemble des pores est rempli d'eau.

Le sol contient deux fractions intervenant principalement dans la sorption des polluants organiques, à savoir les fractions organiques et minérales :

- La **fraction minérale** est principalement constituée de minéraux primaires (quartz, feldspaths, micas ...) et de minéraux secondaires, les oxydes métalliques ou les argiles (Duchaufour, 2001). Généralement, cette fraction n'intervient pas ou peu dans la sorption des polluants organiques sauf quand la teneur en carbone organique (fCO) du sol est faible, c'est à dire lorsque  $fCO < 0,001$  (Gabet, 2004).
- La **fraction organique** est formée en grande partie de cellulose et d'hémicellulose, de lignine et de tanins en plus faibles pourcentages, venant du matériel décomposé. Cette matière organique (MO) contient également de petites quantités de protéines et des fragments d'hydrates de carbone, des composés aminés, phénoliques ou aromatiques issus de l'activité biologique (Pignatello, 1998). Cette fraction intervient fortement dans la sorption des composés organiques tels que les HAP.

## **2. Processus généraux de biodégradation des composés organiques**

Deux processus sont communément impliqués dans la biodégradation des composés organiques (INERIS, 2004) :

- 1) l'utilisation du xénobiotique comme source d'énergie pour la croissance bactérienne (oxydation, réduction, fermentation) ;
- 2) le co-métabolisme, au cours duquel le composé chimique n'est pas utilisé pour la croissance bactérienne mais est dégradé du fait de l'activité métabolique.

### *a. La dégradation primaire*

La dégradation de la molécule organique par les micro-organismes est couplée à une production d'énergie et de carbone au travers d'une série de réactions complexes d'oxydoréduction. Dans ce cas, les substances impliquées sont considérées comme des sources de croissances primaires, puisqu'elles sont directement impliquées dans la croissance bactérienne. Au cours de ce procédé biologique, les électrons subissent des transferts par addition ou retrait au niveau d'intermédiaires tout au long de la chaîne de réactions.

Les réactions biochimiques centrales peuvent être divisées en réactions de fermentation et respiration (Baker et Herson, 1994). Ceci peut être distingué initialement sur la base de l'accepteur terminal d'électron (le composé final est réduit) (tableau 1).

Type de métabolisme	Donneur d'électron	Accepteur terminal d'électron
Fermentation	Composé organique	Composé organique
Respiration	Composé organique ou inorganique	Composé inorganique
Respiration aérobie		Oxygène
Respiration anaérobie		Nitrates, sulfates (NO <sub>3</sub> , SO <sub>4</sub> )

**Tableau 1.** Séquences métaboliques majeures (d'après Baker et Herson, 1994)

**La biodégradation se traduit par une simplification progressive de la structure chimique d'un composé organique de formule C<sub>x</sub> H<sub>y</sub> O<sub>z</sub> N<sub>t</sub> P<sub>u</sub> avec la minéralisation du carbone (sous forme de dioxyde de carbone) et l'obtention de métabolites de faible poids moléculaire, disponibles alors pour la synthèse de constituants cellulaires.**

### *b. Les voies métaboliques*

La biodégradation des composés organiques dans l'environnement dépend de deux voies métaboliques principales :

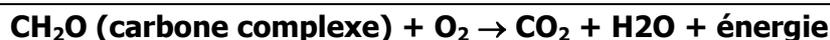
- **la voie aérobie.**
- **la voie anaérobie**

Les micro-organismes obtiennent l'énergie nécessaire pour la croissance cellulaire et le maintien des niveaux de base en catalysant le transfert des électrons d'un électron donneur en un électron accepteur. Des sources importantes d'électrons accepteurs incluent l'oxygène dissous, les nitrates, les sulfates, et le Fe(III) (Tiehm et Schulze, 2003).

#### **\* La voie aérobie**

L'oxydation mono terminale est le principal processus utilisé par la plupart des bactéries dans la respiration, conduisant à la formation de l'alcool primaire puis de l'aldéhyde et de l'acide gras correspondant (Nieder et Shapiro, 1975; Grund *et al*, 1975 ; Soltani, 2004). Les acides gras formés peuvent être oxydés par  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\omega$ -oxydation ; les composés formés pourront par la suite être incorporés aux lipides cellulaires. Une élongation de la chaîne carbonée est alors possible. Cette oxydation mono terminale pour donner l'alcool primaire est catalysée par un ensemble complexe d'hydrolases faisant intervenir un système de transporteur d'électrons permettant l'incorporation de l'atome d'oxygène (cytochrome P450 par exemple).

**Dans la respiration bactérienne, les cycles centraux impliqués dans le métabolisme sont la glycolyse, le cycle de Krebs et le système de transport d'électrons.** La réaction générale se résume comme suit :



Dans le cas de la dégradation par fermentation, la molécule organique est à la fois donneur et accepteur d'électron. Ce processus est le principal fournisseur d'électrons (hydrogène) et contrôle la réaction de déhalogénéation réductrice, mécanisme majeur de l'atténuation naturelle des solvants chlorés.

### **\* La voie anaérobie :**

Ces dernières années, un effort a été apporté pour isoler les micro-organismes anaérobies, élucider les mécanismes biochimiques et réaliser des expérimentations sur le devenir des xénobiotiques en absence d'oxygène. À l'intérieur des zones anaérobies, **les nitrates, le fer (III), les sulfates et le carbone peuvent, servir d'électrons accepteurs terminaux** durant la biodégradation des composés organiques (hydrocarbures pétroliers, composés chlorés, pesticides...).

#### *c. Le cométabolisme*

Dans ce cas, **le polluant ne sert pas de source principale de carbone** ou d'énergie. Le micro-organisme a besoin d'une source primaire de substrat, et le polluant est considéré comme un **substrat secondaire**. Il s'agit alors d'une biodégradation par cométabolisme, dans laquelle un substrat secondaire est biodégradé en même temps qu'un substrat primaire. Ce mode de dégradation est essentiel pour la plupart des polluants organochlorés (Baker et Herson, 1994). Un exemple d'alcane cométabolisé est le cyclohexane dégradé par *Mycobacterium austroafricanum* en présence d'isooctane (Marchal *et al.*, 2003).

### **3. Références bibliographiques sur le devenir des composés organiques dans les sols**

**NB les références indiquées sont celles citées dans le document et ne représente qu'une partie de la bibliographie réunie pour l'étude**

1- Denys S, 2004, Biodégradation des solvants chlorés en conditions naturelles mécanismes et caractérisation Synthèse bibliographique, rapport INERIS, 31 p.

2- Gabet S, 2004, Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique, Université Université de Limoges

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des polluants organiques issus de la combustion incomplète de matières carbonées. Emis dans l'environnement, les sols constituent leur principal point de fuite. Faiblement solubles dans l'eau et peu biodégradables, ce sont des polluants rémanents souvent associés à un caractère toxique et cancérigène. Les techniques actuelles de dépollution des sols reposent sur des moyens lourds, coûteux et présentant souvent des risques environnementaux. Ainsi, l'utilisation de surfactants d'origine biologique présente un potentiel intéressant pour favoriser la remobilisation. L'objectif de ce travail est de caractériser les propriétés d'un biotensioactif produit à partir d'une souche bactérienne récemment isolée d'un sol contaminé, de tester son efficacité à solubiliser trois HAP modèles (fluorène, fluoranthène et pyrène) et de préciser les mécanismes de solubilisation mis en jeu. L'étude de l'adsorption du biotensioactif en réacteurs discontinus et continus a montré une faible sorption vis-à-vis du sol étudié. L'efficacité du biotensioactif pour solubiliser les HAP seuls ou en mélange ternaire a été étudiée en système statique en déterminant le Rapport Molaire de Solubilisation (RMS). Il apparaît que la présence d'un soluté moins hydrophobe partagé à l'interface micelle/eau peut favoriser la solubilisation de composés plus hydrophobes. Les résultats obtenus en colonnes de sols montrent une remobilisation rapide des HAP après injection du biosurfactant, l'efficacité de la solution tensioactive vis-à-vis des HAP pouvant être reliée à leurs valeurs de RMS. Ce travail a été poursuivi par l'étude de l'incidence du taux de contamination sur la remobilisation des HAP. Une augmentation de la quantité de HAP remobilisée avec le taux de contamination du sol est observée jusqu'à saturation des micelles du biotensioactif. Les pourcentages remobilisés dépendent de la molécule et du taux de Matière Organique (MO) des sols. En effet, sur l'horizon de sol plus fortement chargé en MO, la remobilisation suit les propriétés physico-chimiques des polluants, contrairement à un horizon plus pauvre en MO où la fraction minérale semble jouer un rôle non négligeable sur l'adsorption.

3- Soltani M, 2004, Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone.. Thèse Chimie analytique, UMR 7573, Chimie Paris.

Les principaux objectifs de ce travail de recherche étaient (i) l'étude de la composition lipidique de quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas oleovorans* en fonction de la source de carbone, (ii) la détermination des différents voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures comportant une chaîne alkyle et (iii) mieux connaître la composition en  $\beta$ -hydroxy acides lipopolysaccharidiques de leurs membranes extérieures. La première partie de ce travail présente une description qualitative et quantitative des lipides "non liés", labiles en milieu basique et labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* en fonction de l'hydrocarbure (alcanes normaux et ramifiés, phényl et cyclohexyl-alcanes, et 1-alcène) utilisé comme source unique de carbone et d'énergie. Ces résultats ont montré que la structure chimique des lipides identifiés suit celle de l'hydrocarbure fourni: apparition de proportions significatives et dans certains cas très importantes d'acides gras issus de la dégradation de ces composés. Les  $\beta$ -hydroxy acides des LPS sont moins sensibles au changement de la structure de l'hydrocarbure. Le n- $\beta$ -12:0 est toujours dominant alors que les  $\beta$ -hydroxy acides provenant de la dégradation des hydrocarbures peuvent être incorporés aux LPS mais ne constituent que des composés mineurs. La présence d'intermédiaires métaboliques de chaque hydrocarbure dans les lipides "non liés" a permis la détermination des différentes voies métaboliques de dégradation. La deuxième partie de ce travail porte sur la composition lipidique des bactéries *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans* en fonction de la source de carbone (acétate

ou alcane). Cette partie a montré le degrés de variabilité des acides gras chez les bactéries Gram négatives *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus*: substitution des acides gras normaux pairs par des acides gras de même parité et même squelette que l'alcane utilisé. Chez *P. oleovorans* l'utilisation d'alcane courts se manifeste aussi bien sur la distribution des acides gras membranaire que sur la composition en  $\beta$ -hydroxy acides des LPS. Enfin, les  $\beta$ -hydroxy acides issus des quatre bactéries étudiées sont essentiellement normaux pairs de C10 à C14 dont le composé prédominant est dépendant de l'espèce bactérienne.

4- R. Marchal, S. Penet, F. Solano-Serena et J.P. Vandecasteele, 2003, Gasoline and Diesel Oil Biodegradation, Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, Vol. 58, No. 4, pp. 441-448.

5- Tiehm A et Schulze S, 2003, Intrinsic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation for Groundwater Remediation, Revue de l'Institut Français du Pétrole, Volume 58, n° 04, p. 449 - 462

Abstract Intrinsic biodegradation, representing the key process in natural attenuation, is increasingly considered for the remediation of contaminated sites as an alternative to more active measures. In this paper, intrinsic biodegradation is discussed with respect to BTEX and PAH. In the first part, an overview is given summarizing the current understanding of microbial aromatic hydrocarbon degradation and the methods available for the assessment of intrinsic bioremediation. In the second part, the concept and selected results of a case study are presented. Both aerobic and anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons contribute to pollutant elimination at contaminated sites such as former manufactured gas plants and tar-oil polluted disposal sites. Intrinsic biodegradation processes usually result in a sequence of redox zones (methanogenic, sulfate-reducing, Fe(III)-reducing, denitrifying, aerobic) in the groundwater plume downgradient the source of contamination. Methods to assess redox zonation include hydro- and geochemical analysis, measurement of the redox potential, and determination of hydrogen. Biodegradation of target pollutants can be demonstrated by alterations in the pollutant profiles, isotopic fractionation, specific metabolic products, and by microcosm studies with authentic field samples. Microcosm studies in particular are a useful tool to identify degradation mechanisms and to understand the role of specific electron acceptors and redox conditions. In a case study, intrinsic biodegradation was examined at a tar-oil polluted disposal site. Due to the low sorption capacity of the aquifer, decreasing pollutant concentrations with increasing plume length were attributed predominantly to biodegradation. Sulfate reduction and Fe(III) reduction were the most important redox processes in the anaerobic core of the groundwater plume. Changing pollutant profiles with increasing plume length indicated active biodegradation processes, e.g. biodegradation of toluene and naphthalene in the anaerobic zones. In microcosms amended with model pollutants, biodegradation of toluene and ethylbenzene was observed under sulfate-reducing conditions. Degradation of toluene, ethylbenzene, benzene and naphthalene occurred in the presence of Fe(III). Under aerobic conditions, all BTEX and PAH.

6- Duchaufour P., 2001, Introduction à la Science du Sol (DUNOD), 300p.

7- Pignatello JJ, 1998, Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants, Adv Colloid Interf Sci; 76–77, 445–67.

8- Baker et Herson, 1994, Bioremediation, McGraw-Hill Inc., 375 p.

9- Grund A, Shapiro J, Fennewald M, Bacha P, Leahy J, Markbreiter K, Nieder M, Toepfer M, 1975, Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*, J Bacteriol. 123(2): 546–556.

We have studied the appearance of whole-cell oxidizing activity for n-alkanes and their oxidation products in strains of *Pseudomonas putida* carrying the OCT plasmid. Our results indicate that the OCT plasmid codes for inducible alkane-hydroxylating and primary alcohol-dehydrogenating activities and that the chromosome codes for constitutive oxidizing activities for primary alcohols, aliphatic aldehydes, and fatty acids. Mutant isolation confirms the presence of an alcohol dehydrogenase locus on the OCT plasmid and indicated the presence of multiple alcohol and aldehyde dehydrogenase loci on the *P. putida* chromosome. Induction tests with various compounds indicate that inducer recognition has specificity for chain length and can be affected by the degree of oxidation of the carbon chain. Some inducers are neither growth nor respiration substrates. Growth tests with and without a gratuitous inducer indicate that undecane is not a growth substrate because it does not induce alkane hydroxylase activity. Using a growth test for determining induction of the plasmid

alcohol dehydrogenase it is possible to show that heptane induces this activity in hydroxylase-negative mutants. This suggests that unoxidized alkane molecules are the physiological inducers of both plasmid activities.

10- Nieder et Shapiro, 1975, Physiological function of the Pseudomonas putida PpG6 (Pseudomonas oleovorans) alkane hydroxylase: monoterminial oxidation of alkanes and fatty acids, J Bacteriol, 122(1): 93-98.

*Pseudomonas putida* PpG6 is able to utilize purified n-alkanes of six to ten carbon atoms for growth. It can also grow on the primary terminal oxidation products of these alkanes and on 1-dodecanol but not on the corresponding 2-ketones or 1,6-hexanediol, adipic acid, or pimelic acid. Revertible point mutants can be isolated which have simultaneously lost the ability to grow on all five n-alkane growth substrates but which can still grow on octanol or nonanol. An acetate-negative mutant defective in isocitrate lysase activity is unable to grow on even-numbered alkanes and fatty acids. Analysis of double mutants defective in acetate and propionate or in acetate and glutarate metabolism shows that alkane carbon is assimilated only *via* acetyl-coenzyme A and propionyl-coenzyme A. These results support the following conclusions: (i) The n-alkane growth specificity of *P. putida* PpG6 is due to the substrate specificity of whole-cell alkane hydroxylation; (ii) there is a single alkane hydroxylase enzyme complex; (iii) the physiological role of this complex is to initiate the monoterminial oxidation of alkane chains; and (iv) straight-chain fatty acids from butyric through nonanoic are degraded exclusively by beta-oxidation from the carboxyl end of the molecule.

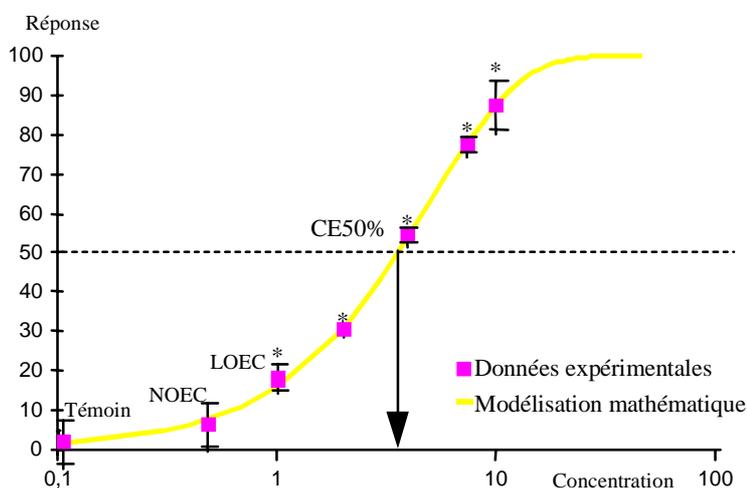
# **IV. ELEMENTS (ECO)TOXIQUES RECHERCHES**

## 1. Tests de toxicité – rappel des principes

Les essais conduits au laboratoire permettent d'estimer les relations entre l'exposition aux polluants d'un organisme et sa réponse. Concernant la durée d'exposition et le type d'effet, différentes catégories de tests peuvent être distinguées :

- **Tests de toxicité aiguë** ont lieu sur une courte période comparativement au cycle de vie de l'organisme. Ce terme est utilisé pour définir soit l'exposition, soit la réponse à cette exposition (effet). Un effet toxique aigu est donc induit et observé sur une courte période d'exposition.
- **Tests de toxicité chronique** sont réalisés pendant des expositions plus longues (en général choisies pour inclure environ 10 % du cycle de vie de l'espèce) ou effet constaté lors d'une telle exposition (effet chronique). Ces effets sur le long terme sont à relier aux changements de métabolisme, de reproduction, de croissance ou d'aptitude à survivre. Les concentrations d'exposition sont en général plus faibles que celles utilisées pour les tests de toxicité aiguë.
- **Tests de génotoxicité** permettent de détecter la capacité d'une substance ou d'un processus physique à générer des dommages sur le matériel génétique ou sur le génome (par exemple : mutation, dommages chromosomiques, etc...).

L'évaluation au laboratoire de la toxicité des polluants utilise des tests mono-spécifiques (sur une seule espèce) et consiste à mesurer la réponse d'organismes sélectionnés et homogènes lors de leur exposition à des polluants (substances pures, effluents, sols contaminés...). Une courbe concentration-réponse est ainsi établie par exposition des organismes à des quantités croissantes de polluants. Les organismes employés dans les tests biologiques appartiennent à différents niveaux trophiques des écosystèmes considérés (aquatiques et/ou terrestres) et sont choisis pour être représentatifs (producteurs, consommateurs, décomposeurs).



\* : indique un traitement statistiquement différent du témoin

**Figure 1. Courbe théorique « Concentration-Réponse »(ADEME, 2002)<sup>2</sup>**

<sup>2</sup> M.J. JOURDAIN, A. BISPO, P. VASSEUR, V. FERRIER, C. GRAND, 2002. Ecotoxicité des sols et des déchets : Résultats des tests biologiques. ADEME ÉDITIONS. Angers. 95 p.

## 2. Descripteurs toxicologiques rencontrés

**CE50 (ou CEx) = Concentration Effective 50 %** = concentration en substance qui induit des effets (inhibition de croissance, morts, effets sur la reproduction) chez 50% de la population d'organismes étudiée

**CL50 (ou CLx) = Concentration Létale 50 %** : concentration en substance qui induit la mort de 50% de la population d'organismes étudiée, pendant un temps donné, par administration unique. Plus la concentration létale est faible, plus la substance est toxique.

**DL50 (ou DLx) = Dose Létale 50%** : dose de substance qui induit la mort de 50 % dans la population d'organismes étudiée, pendant un temps donné, par administration unique. Plus la dose létale est faible, plus la substance est toxique

**LOEC = Lowest observed effect concentration** = concentration la plus faible à laquelle un effet statistiquement significatif est observé par rapport au témoin

**NOEC = No Observed Effect Concentration** = Concentration sans effet observé. C'est la concentration la plus élevée pour laquelle aucun effet statistiquement significatif n'est observé par rapport au témoin

## 3. Données toxicologiques

Il faut distinguer la toxicité aiguë (causant la mort ou des désordres physiologiques importants immédiatement ou peu de temps après l'exposition), subaiguë (effets dus à des doses plus faibles, se produisant à court terme, sur des organes cibles, parfois réversibles), ou chroniques (causant des effets irréversibles à long terme par une absorption continue de petites doses de polluants ou des effets cumulatifs).

**Nota** : un choix s'est porté sur l'utilisation des données de toxicologie aiguë au lieu des données chroniques qui pouvaient sembler plus appropriées pour les familles de composés étudiées, ce choix a été fonction de la disponibilité des données aiguës en comparaison aux données chroniques (cf. banques de données spécialisées). Néanmoins, les données de cancérogénicité sont fournies.

### \* Toxicité aiguë pour les mammifères :

Selon les effets observés en aigu chez les animaux, il est distingué plusieurs niveaux de toxicité par le département US de l'Agriculture (cf. tableau 2):

	<b>Voie orale DL50 (mg/kg)</b>	<b>Voie dermale DL50 (mg/kg)</b>	<b>Inhalation CL50 (mg/kg)</b>
<b>Très toxique</b>	0-50	0-200	0-0,2
<b>Modérément toxique</b>	>50-500	>200-2000	>0,2-2
<b>Faiblement toxique</b>	>500-5 000	>2 000-20 000	>2-20
<b>Pratiquement non toxique</b>	>5 000	>20 000	>20

**Tableau 2. Niveaux de toxicité aiguë en fonction des valeurs de DL50 (CL50) pour les voies orale, dermale et l'inhalation<sup>3</sup>**

<sup>3</sup> U.S. Department of Agriculture, Forest Service by Information Ventures, Inc. Trifluralin. Pesticide Fact Sheet. Disponible en ligne : [http://www.fluorideaction.org/pesticides/trifluralin.usda\\_fact\\_sheet.htm](http://www.fluorideaction.org/pesticides/trifluralin.usda_fact_sheet.htm)

Néanmoins, une autre classification des effets liée à une toxicité aiguë chez le rat est disponible (Directive européenne 67/548 du 18 septembre 1979) (tableau 3):

	<b>Voie orale DL50 (mg/kg)</b>	<b>Voie cutanée DL50 (mg/kg)</b>	<b>Inhalation CL50 (mg/l/4 heures)</b>
<b>Très toxique</b>	≤ 25	≤ 50	≤ 0,5
<b>Toxique</b>	25-200	50-400	0,5-2
<b>Nocif</b>	200-2000	400-2000	2-20

**Tableau 3.** Niveaux de toxicité aiguë en fonction des valeurs de DL50 (CL50) pour les voies orale, dermale et l'inhalation selon l'UE

### **\* Cancérogénicité :**

L'IARC (International Agency for Cancerogenicity) a défini plusieurs classes de répartition des effets cancérogènes des substances chimiques <sup>4</sup>:

- Groupe 1 : L'agent (mélange) est cancérigène pour l'Homme
- Groupe 2A : L'agent (mélange) est probablement cancérigène pour l'Homme
- Groupe 2B : L'agent (mélange) est potentiellement cancérigène pour l'Homme
- Groupe 3 : L'agent (mélange) ne peut être classé pour sa cancérogénicité pour l'Homme
- Groupe 4 : L'agent (mélange) n'est probablement pas cancérigène pour l'Homme

L'Union Européenne (JOCE L110A du 04/05/1993) a également déterminé un classement des substances cancérogènes : (le lien internet pour la classification des substances selon l'Union Européenne : <http://apps.kemi.se/ndclass/SpecificSubstance.asp>)

- **Première catégorie** : substances que l'on sait être cancérogènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour établir l'existence d'une relation de cause à effet entre l'exposition de l'homme à de telles substances et l'apparition d'un cancer.
- **Deuxième catégorie** : substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'homme. On dispose de suffisamment d'éléments pour justifier une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances peut provoquer un cancer. Cette présomption est généralement fondée, 1) sur des études appropriées à long terme sur l'animal, 2) sur d'autres informations appropriées.
- **Troisième catégorie** : substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles mais pour lesquelles les informations disponibles ne permettent pas une évaluation satisfaisante. Il existe des informations issues d'études adéquates sur les animaux, mais elles sont insuffisantes pour classer la substance dans la deuxième catégorie.

<sup>4</sup> IARC. List of IARC Evaluation. Disponible en ligne <http://193.51.164.11/monoeval/grlist.html>

#### 4. Données écotoxiques

##### **\* Tests d'écotoxicité:**

Des niveaux de toxicité aiguë en fonction des résultats de CL50 obtenus peuvent être différenciés (cf. tableau n°4).

Catégorie	poissons et invertébrés aquatiques CL50 aiguë (mg/l)
Très toxique	<0,1
Toxique	0,1-1
Modérément toxique	>1-10
Faiblement toxique	>10-100
Non toxique	>100

**Tableau 4. Catégories de toxicité aiguë en fonction des valeurs de CE50 obtenues lors de tests sur poissons ou invertébrés aquatiques<sup>5</sup>**

Le niveau de concentration obtenu en CEx doit être petit (<0,1 mg/l) pour que la toxicité soit considérée comme importante.

##### **\* Facteur de bioaccumulation :**

Une substance s'est bioaccumulée si  $BCF > 100$  ( $\log BCF > 2$ )<sup>6</sup>

##### **\* PNEC (Concentration prévisible sans effet pour l'environnement)**

Les PNEC ne sont pas toujours disponibles dans la bibliographie, c'est pourquoi elles ont été calculées pour un certain nombre de micropolluants en utilisant les méthodes de l'US-EPA, ou de la Communauté Européenne. Le principe est de diviser la valeur la plus faible obtenue (CE50, NOEC) lors des tests écotoxiques par un facteur de sécurité adéquat (cf. tableau n°5).

Informations disponibles	Facteur d'extrapolation
Au moins 1 CL50 d'un essai court terme pour chacun des 3 niveaux trophiques standards (poisson, invertébré et algues)	1000 à la plus petite valeur
1 NOEC d'un essai long terme (poisson ou invertébré)	100
2 NOEC d'essais long terme pour 2 niveaux trophiques (poisson et/ou invertébré et/ou algues)	50 à la plus petite valeur
3 NOEC d'essais long terme pour 3 niveaux trophiques (poisson, invertébré et algue le plus souvent)	10 à la plus petite valeur
Données de terrain ou de mésocosmes	Évalué au cas par cas

**Tableau 5. Méthode de calcul des PNEC selon la Communauté européenne<sup>7</sup>**

<sup>5</sup> U.S. Department of Agriculture, Forest Service by Information Ventures, Inc. Trifluralin. Pesticide Fact Sheet. Disponible en ligne : <http://www.fluorideaction.org/pesticides/trifluralin.usda.fact.sheet.htm>

<sup>6</sup> SDAGE Rhône- Méditerranée- Corse. Guide technique n°7 : pollution toxique et écotoxicologie, notions de base. Novembre 2002. 84 p.

<sup>7</sup> EC European Commission. Technical guidances document in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for

# **V. PRINCIPAUX BIOPROCEDES APPLIQUES AUX SOLS POLLUES**

## **1. Les procédés de traitement des sols pollués**

Les procédés de décontamination des sols peuvent être regroupés selon quatre familles distinctes :

- le confinement : les polluants ne sont pas traités mais isolés pour empêcher leur migration.
- les traitements hors-sites : les déchets sont emmenés et traités sur des sites appropriés.
- les traitements sur site ou *in-situ* : le sol est laissé sur place et les polluants sont soit extraits et traités en surface, soit dégradés, soit fixés dans le sol.
- les traitements "*on site*" : la terre est excavée et traitée sur le site.

Les techniques de traitement des sites sont constituées globalement par trois approches :

- La première considère la terre polluée comme un déchet qu'il faut excaver puis mettre en décharge ou incinérer.
- La deuxième est celle des chimistes et des hydrogéologues. Elle nécessite des techniques de pompage, d'extraction sous vide, de confinement et de lavage.
- La troisième est constituée par les biotechnologies (bioremédiation...).

Par ailleurs, deux philosophies se distinguent. On peut soit chercher à neutraliser la pollution ce qui implique qu'elle reste sur place mais que ses effets sont réduits à néant ou, au contraire, chercher à détoxifier le site c'est à dire à éradiquer totalement la pollution. Seule deux techniques répondent à la neutralisation. Ce sont le confinement et la stabilisation. Toutes les autres techniques vont chercher à éliminer complètement la pollution du site.

## **2. La technologie de décontamination (d'après Varillon, 2002)<sup>8</sup>**

Les techniques mises en jeu se décomposent en cinq catégories principales :

- la mise en sécurité,
- l'évacuation,
- le traitement chimique,
- le traitement thermique,
- le traitement biologique.

Concernant le traitement biologique, plusieurs méthodes sont disponibles :

### ***Bioréacteur***

Cette méthode s'applique aussi bien pour des matériaux solides que pour de l'eau ou pour des gaz avec toutefois des petites variantes opérationnelles. Cependant, dans les trois cas la biodégradation des polluants est réalisée dans un contenant installé sur le site.

- Traitement des matériaux solides : le principe est d'homogénéiser le milieu puis de le mélanger avec de l'eau pour obtenir de la boue. Celle-ci est ensuite mélangée avec des micro-organismes dans des réacteurs. Au final, sont séparés l'air qui est rejeté, la terre qui est remise sur place et l'eau qui est recyclée.

---

<sup>8</sup> Varillon E., 2002, Estimation des sols industriels pollués, Ecole Supérieure des Géomètres et Topographes, Mémoire d'études, 73 pages

- Traitement de l'eau : le principe est le même. L'eau est placée dans des colonnes où elle est mise en contact avec des produits neutres qui servent de support aux micro-organismes fixés.
- Traitement des gaz : on utilise dans ce cas un biofiltre qui est généralement formé de compost ce qui favorise l'expansion des bactéries, dans lequel on fait passer un flux gazeux à traiter. L'efficacité de ce procédé est estimée à 90% ce qui représente de très bons résultats pour une technique pas trop coûteuse.

### ***Compostage et landfarming***

C'est une méthode sur site qui consiste à excaver le sol en cherchant à favoriser un mécanisme d'aérobie naturel. Les résultats dépendent de l'aération, du taux d'humidité et de l'apport en nutriment.

- Le compostage : la terre est mélangée à un substrat organique, réparti en plusieurs tas sur le site pour favoriser l'action des micro-organismes. La méthode est très longue mais très fiable. Elle s'applique pour des contaminants aisément biodégradables.
- Le landfarming : Le nom de cette technique traduit son mode opératoire. Le matériau pollué est traité comme une surface agricole. Le sol pollué est répandu sur une grande surface plane imperméable, des fertilisants sont additionnés et un travail régulier du sol permet de l'aérer.

Ces deux techniques ont un meilleur rendement l'été c'est à dire avec des températures élevées. Le taux d'humidité doit être constant.

### ***Biopile***

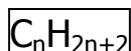
Cette technique couple la biodégradation et la ventilation, ( le bioventing) sur le sol excavé recouvert d'une membrane imperméable. Des nutriments et des micro-organismes sont ajoutés pour améliorer le rendement. La technique consiste alors à aspirer les gaz volatils puis à injecter de l'air frais tout en prélevant régulièrement des échantillons de contrôle. L'efficacité de ce traitement est de 70% à 90% et il s'applique à tous les polluants organiques y compris les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Cette technique a permis d'ouvrir le marché biologique à de nouvelles pollutions plus difficiles. Toutefois, il reste pour l'instant plus cher que le traitement *in-situ* et il nécessite beaucoup de temps et de place.

**Nota :** Les différentes techniques présentées ci-dessus donnent lieu à de multiples variantes de conception et de mise en oeuvre. En effet, il est de pratique courante de les combiner ou de les utiliser successivement ce qui permet d'améliorer les performances du traitement. Ainsi, par exemple, le bioventing, mélange de la biodégradation et de la ventilation, permet des rendements de plus de 90% pour les hydrocarbures.

## **VI. LES ALCANES**

## 1. Caractéristiques physico-chimiques

Ce sont des hydrocarbures à chaîne ouverte, linéaires ou ramifiés ne comportant que des liaisons simples et dont la formule brute est :



Sous 1 atmosphère, les alcanes sont sous l'état gazeux jusqu'au C4 (butane), liquide (jusqu'à C17) et solide au-delà. Ils se présentent alors comme une huile lourde et leur point de fusion n'excède pas les 100°C (tableau 6). Il faut noter que les molécules ramifiées sont plus volatiles que les linéaires.

Les alcanes les plus complexes correspondent aux catégories de la pétrochimie : le classement se fait essentiellement par rapport aux températures d'ébullition (séparation réalisée par distillation dans les tours de distillation de la raffinerie).

	Etat, à 25°C, sous 1 atm	T ebu / °C sous 1 atm	T fus / °C	Densité	Nombre de C
Méthane	gazeux	-161,5	-183	-	1
Ethane	gazeux	- 89	-172	-	2
Propane	gazeux	- 42	- 188	-	3
n-Butane	gazeux	- 0,5	- 135	-	4
n-Pentane	liquide	36,1	-130	0,626	5
n-Hexane	liquide	68,7	- 95	0,659	6
n-Heptane	liquide	98,4	- 91	0,684	7
C20	solide	342	37	-	20
C30	solide	446	66	-	30

**Tableau 6.** Propriétés physiques de quelques alcanes linéaires

Les liaisons C—C et C—H des alcanes étant respectivement non et très peu polarisées, résultat leur rupture est extrêmement difficile.

**Les alcanes présentent donc une très grande stabilité chimique et sont très peu réactifs. Ils ne sont réactifs que sous des conditions radicalaires, de haute température ou par photochimie. Les alcanes sont tous absolument insolubles dans l'eau. Toutefois ils servent eux-mêmes de solvants pour les composés organiques non-polaires liquides et solides.**

De plus, comme tous les composés organiques, les alcanes sont combustibles, i.e. qu'ils brûlent en présence d'oxygène et donnent les produits suivants :

- $\text{CH}_4 + 2 \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$
- $\text{CH}_4 + \text{O}_2 \rightarrow \text{C} + 2 \text{H}_2\text{O}$

## 2. Caractéristiques (éco)toxiques des alcanes

### a. Données toxicologiques

De manière générale, on peut dire que tous les solvants pétroliers sont des dépresseurs du système nerveux central : leur inhalation répétée ou prolongée conduit à des manifestations telles que maux de tête, vertiges, sensations d'ébriété... Leur contact prolongé avec la peau occasionne une action dégraissante et desséchante se traduisant par des irritations ou des dermatoses.

L'hexane peut entraîner, lors d'une exposition prolongée, une atteinte des nerfs périphériques conduisant à une paralysie des membres inférieurs cependant, sa toxicité aiguë reste faible (tableau 7).

Voie	Espèce	CL50/DL50
Inhalation	Rat	73680 ppm/4 h
Orale	Souris	5000 mg/kg
Cutanée	Lapin	3000 mg/kg

**Tableau 7.** Toxicité aiguë du n-hexane (INRS, 2005)

**Durant leur métabolisation chez l'homme, les alcanes subissent sur leur squelette hydrocarboné, une réaction de fonctionnalisation, les transformant en alcools, moins lipophiles et plus hydrophiles.**

Cette étape d'hydro-solubilisation évite le stockage dans les compartiments lipidiques et doit être considérée comme bénéfique pour l'organisme. Cependant, c'est lors d'une seconde étape dite réaction de transfert (ou de conjugaison) que la phase de détoxification est enclenchée.

**L'hexane est métabolisé par le système des oxygénases à cytochrome P450. L'oxydation en position 2 génère un métabolite toxique, le 2,5-hexanedione (INCHEM, 1991).**

**Aucun des alcanes ne possède de propriétés carcinogènes, mutagènes ou tératogènes. L'INRS précise néanmoins la toxicité du n-hexane pour les cellules germinales du rat et l'embryotoxicité chez la souris (Fiche 113, 2005).**

### b. Données écotoxiques

Dans le tableau 8 sont exprimées les valeurs de toxicité aiguë aquatique de quelques alcanes linéaires et cycloalcanes : **on remarque que la toxicité des alcanes croît avec le nombre de carbone.**

Cependant, il est à noter que la forte volatilité des alcanes influence les essais en laboratoire et nécessite des systèmes clos. Il a également été montré que **les cycloalcanes sont éliminés complètement par l'organisme, ils présentent ainsi un faible danger d'intoxication chronique.**

Substrat	Solubilité en mg/L	CL 50 (mg/L) Calculée	Toxicité <sup>9</sup>
Pentane	38	59	Faiblement toxique
n-Hexane	9,5	22	Faiblement toxique
n-Heptane	2,7	non disponible	non disponible
n-Octane	0,66	3,3	Modérément toxique
n-Decane	0,05	0,6	Toxique
Cyclopentane	non disponible	140	Non toxique
Cyclohexane	55	2,4 - 63	Faiblement toxique
Méthylcyclohexane	non disponible	24	Faiblement toxique
Cycloheptane	non disponible	0,74	Toxique

**Tableau 8.** Toxicité aiguë chez *Daphnia magna* de certains alcanes (Irwin *et al.* 1997).

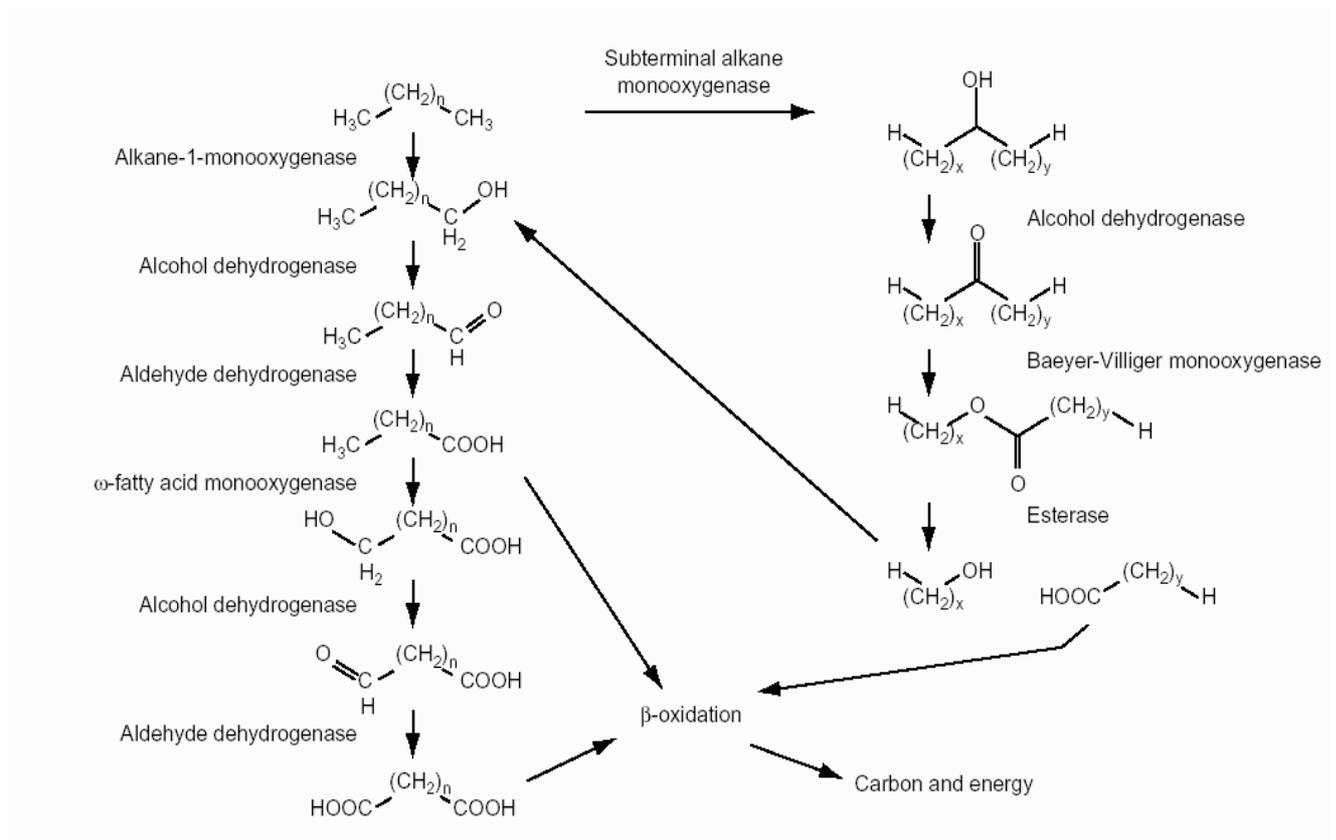
## 3. Biodégradation aérobie

### a. Cas des alcanes linéaires

La première étape dans la dégradation aérobie des alcanes par les bactéries, levures et champignons, est catalysée par des oxygénases (figure 2). Il existe deux voies principales d'oxydation :

- L'oxydation terminale amène à la formation d'acides gras, qui entrent dans le mécanisme de  $\beta$ -oxydation. Alternativement, l' $\omega$ -hydroxylation par la mono-oxygénase ou l'hydroxylase peut avoir lieu, produisant des acides dicarboxyliques.
- L'oxydation sub-terminale augmente la concentration en alcools secondaires qui sont oxydés en cétones. Une mono-oxygénase de Baeyer-Villiger convertit les cétones en esters qui sont clivés par une estérase (Gonçalves *et al.*, 2004) en alcool et acide gras.

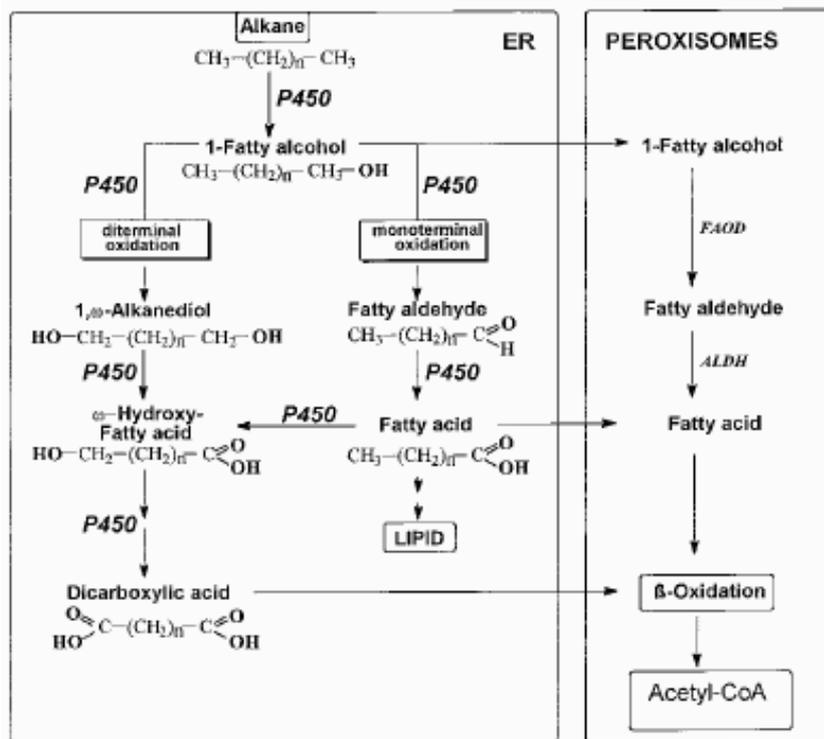
<sup>9</sup> Classement de toxicité aiguë selon le département US de l'Agriculture



**Figure 2.** Voie de dégradation des alcanes par oxydation terminale, sub- et bi-terminale (d'après Beilen *et al.*, 2003)

**Les alcanes légers (exemple : propane) sont métabolisés *via* l'oxydation terminale aussi bien que sub-terminale (Beilen *et al.*, 2003).**

L'oxydation sub-terminale a également lieu pour les alcanes lourds ( $C_{10}$ - $C_{24}$ ) par des espèces de *Penicillium* (Cerniglia *et Perry*, 1974), *Bacillus*, *Pseudomonas* (Koch *et al.*, 1991), et *Rhodococcus sp* MS11 (Rapp *et Gabriel-Jürgens*, 2003) et Q15 (Whyte *et al.*, 2002). Scheller *et al.* (1998) propose un schéma de dégradation des n-alcanes et sa localisation sub-cellulaire chez la levure *Candida maltosa* (figure 2).



**Figure 3.** Schéma récapitulatif de la voie de dégradation aérobie des n-alcanes et sa localisation chez *C. maltosa* incluant le rôle des P450 dans la cascade d'oxygénation  
ER :Reticulum endoplasmique ; FAOD : oxydase à acide gras ; ALDH : déshydrogénase à aldéhyde

Substrat	Organisme	Produits identifiés
Heptane	Aucune désignation	Acide carboxylique C <sub>5</sub> , C <sub>2</sub> et C <sub>1</sub>
Hexane	P473	Acide carboxylique C <sub>6</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3</sub> et C <sub>2</sub>
Heptane		Acide carboxylique C <sub>7</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3</sub> et C <sub>2</sub>
Heptane		Acide succinique et carboxylique C <sub>7</sub> , C <sub>6</sub> , C <sub>5</sub> , C <sub>4</sub> , C <sub>3</sub> et C <sub>2</sub>
Hept-1-ène		Acide glutarique, acide pent-4-énoïque, acide hept-6-énoïque
Heptane	<i>P. aeruginosa</i>	Hept-1-ène
Heptane	'R'	Acide Heptanoïque, Acide pimélique
Octane		Acide Butyrique, acide acétique, acide adipique et acide subérique
Octane	Aucune désignation	Acide acétique, acide propionique et acides non identifiés
Décane	<i>P. aeruginosa</i> 9904	Acides C <sub>7</sub> , C <sub>8</sub> , C <sub>9</sub> , C <sub>10</sub> ; 1-, 2-, 3-, 4- et 5-décanol+ 1-5-kétones
Tétradéc-1-ène	<i>P. aeruginosa</i>	Acide tétradécanoïque et acide tétradéc-13-énoïque
Hexadécane	Aucune désignation	Hexadécanol
Hexadécane	<i>P. aeruginosa</i>	Acide palmitique, acide palmitoléique, acide stérique, acide oléique, acide b-hydroxylaurique et b-hydroxymyristique
Hexadécane	Aucune désignation	Hexadéc-1-ène
Octadécane	Aucune désignation	Octadécanol

**Tableau 9.** Produits métaboliques issus de la dégradation des alcanes par *Pseudomonas*

**Peu d'études traitent du devenir dans les sols de l'hexane. Walker et Cooney (1973) ont montré que *Cladosporium resinae* était capable d'oxyder l'hexane en présence d'oxygène.**

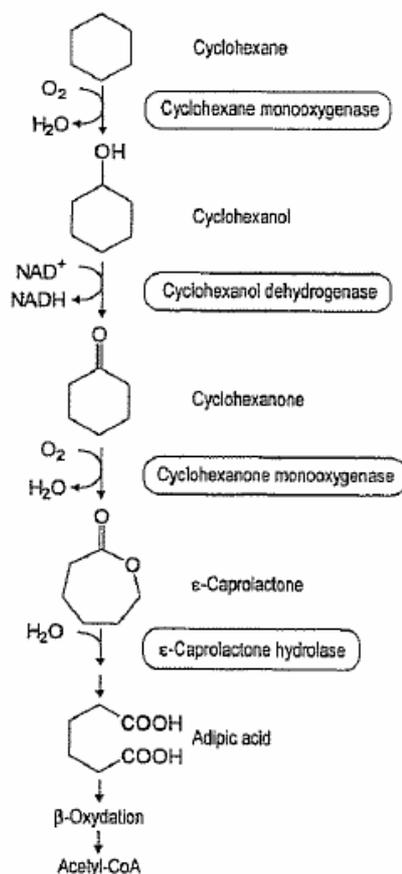
Des voies générales de dégradation des alcanes sont proposées mais peu d'études s'intéressent au composé seul. En effet, les publications consultées s'intéressent le plus souvent aux microorganismes présents dans les sols. Le tableau 9 illustre différentes souches de *Pseudomonas* pouvant dégrader certains alcanes (Bird et Molton, 1969).

### b. Cas des cycloalcanes

Les cycloalcanes sont des composés mineurs des huiles minérales et restent relativement résistants aux attaques microbiennes (Fritsche et Hofrichter, 2000). Ceci est lié à l'absence d'un groupe méthyl terminal compliquant la biodégradation.

**Peu d'espèces sont capables d'utiliser le cyclohexane comme source seule de carbone ; la façon la plus commune consiste en un cométabolisme par des cultures mixtes.**

Le mécanisme de dégradation du cyclohexane est présenté sur la figure 3, les chaînes alkyles permettent l'action des micro-organismes. Il en résulte une multitude de dérivés cétoniques pour aboutir à la formation d'Acétyl-CoA (Perry, 1979).



**Figure 4.** Voie métabolique générale du cyclohexane

## 4. Biodégradation anaérobie

Les scientifiques ont longtemps supposé que la dégradation des hydrocarbures (notamment les alcanes) ne pouvait se réaliser en conditions anaérobies. Cependant, ces dix dernières années, plusieurs micro-organismes ayant la capacité de dégrader les composés aromatiques et aliphatiques ont été isolés. **Beaucoup de ces organismes sont des dénitrificateurs ou des sulfato réducteurs et appartiennent aux subclasses  $\beta$  et  $\alpha$  des protéobactéries (Heider *et al.*, 1999).**

La dégradation anaérobie des n-alcanes a été rapportée comme issue de l'action de protéobactéries (Aeckersberg *et al.*, 1998 ; So *et al.*, 2003 ; Ehrenreich *et al.*, 2000).

Trois types distincts de bactéries dénitrifiantes ont été isolés en cultures pures :

4. la souche HxN1 (*Azoarcus sp.*) qui croît dans un milieu enrichi en n-hexane,
5. la souche OcN1 (*Rhodocyclus*) isolée d'une culture contenant du n-octane,
6. la souche HdN1 (*Ectothiorhodospira*) pouvant croître sur un milieu contenant du n-hexadécane.

**Le principe biochimique du métabolisme anaérobie des alcanes est encore peu connu.** Basé sur le modèle des acides gras de la souche Hxd3 (*Desulfobacterium oleovorans*), qui montre la formation de chaînes impaires d'acides gras à partir de chaînes paires d'alcanes, la dégradation anaérobie comporte une réaction de carboxylation ou carbonylation comme cela a été proposé par Aeckersberg *et al.* (1998). L'attaque initiale dans la dégradation anaérobie des composés hydrocarbonés n'inclut pas d'étape oxygène-dépendante, mais suppose un couplage à un métabolite cellulaire (toluène succinate par exemple).

## **5. Etudes de terrain**

La recherche d'étude de terrain a débuté à partir d'un serveur Internet générique (google) mais l'absence de documents intéressants pour notre étude nous a conduit à utiliser des sites plus spécifiques (pubmed, sciencedirect et les sites gouvernementaux de l'EPA ou Clu-In). Néanmoins, la recherche a été infructueuse pour cette famille de composés nous amenant à utiliser d'autres mot-clés que ceux cités précédemment comme « field study » ou « biostimulation » et/ou « paraffinic compounds ».

**Les études en laboratoire concernant les alcanes seuls sont réalisées d'une part pour tester la capacité de métabolisation de certaines souches de microorganismes ou de nouvelles techniques de traitement des sites et sols pollués.** De plus, tous les alcanes ne sont pas étudiés.

Le devenir des alcanes dans les sols n'est jamais traité dans les travaux de manière explicite du fait de leur présence sous forme de mélange notamment, dans les solvants pétroliers. En effet, **les cas de terrain traitent le plus souvent d'un mélange de HAP et d'alcanes et seule la dégradation des HAP est étudiée de façon précise** (Olivieri *et al.*, 1976).

**Le bilan sur les alcanes montre les lacunes des travaux de terrain sur cette famille de composés comparée aux HAP ou aux dérivés chlorés. Cette remarque est peut être liée à la nature même des alcanes qui sont des composés peu réactifs et stables chimiquement.**

## **6. (Eco)toxicité des métabolites**

Les n-alcanes sont les principaux composés présents dans les contaminations par les huiles minérales. Les hydrocarbures à longue chaîne (C10 à C24) sont dégradés très rapidement. Les composés à chaîne courte (moins de C9) sont toxiques pour beaucoup de microorganismes, mais se volatilisent rapidement des sites contaminés par les hydrocarbures. Le potentiel de dégradation des alcanes est fonction de la longueur de la chaîne carbonée.

Les données de la littérature concernant les produits formés après dégradation des alcanes par différentes souches bactériennes sont résumées dans le tableau 9. La recherche des données explicitant la dégradation par les micro-organismes présents dans les sols de ce type de composé organique a abouti à l'obtention d'une liste d'environ 20 publications dont les données restent restreintes concernant les produits formés et les facteurs intervenant dans les voies de dégradation aérobie et anaérobie.

La plupart des travaux montrent un potentiel de dégradation existant pour les molécules à longue chaîne carbonée et identifient les micro-organismes impliqués dans ces voies chimiques, cependant, il est impossible d'aboutir à des fiches synthétiques complètes comme réalisées pour les HAP et solvants chlorés (cf sections suivantes).

**Selon les travaux disponibles, les métabolites obtenus en laboratoire sont des composés d'acides gras et d'alcool ayant une toxicité moindre voire inexistante (cf tableau 9).**

Dans le cas particulier de l'hexane, la métabolisation chez les mammifères consiste en une série d'oxydations successives aboutissant à la formation majoritaire d'hexan-2-ol puis d'hexane-2,5-dione. Ce dernier métabolite très réactif est le toxique ultime responsable de polynévrites neuronales ([www.inchem.org](http://www.inchem.org) ; [www.atsdr.cdc.gov](http://www.atsdr.cdc.gov) ; [www.epa.gov](http://www.epa.gov) ; [www.bioline.org.br](http://www.bioline.org.br)).

**Néanmoins, le manque de données concernant la métabolisation de l'hexane par les micro-organismes du sol n'a pas permis d'aboutir à des fiches de synthèse ou à des informations précises sur les métabolites susceptibles de se former, ce qui explique l'absence de ce composé dans le tableau 10 récapitulatif.**

La consultation des sites spécialisés comme Clu-In, US-EPA, IFP, n'a pas permis d'aboutir à des informations précises sur les facteurs physiques influençant (température, pH, durée, autres contaminants...) la biodégradation. Cette recherche bibliographique permet néanmoins de préciser que des études devraient être envisagées pour conclure sur la toxicité des métabolites obtenus sur l'ensemble des molécules type alcanes.

**Concernant la localisation des voies de métabolisation et des produits de dégradation des alcanes, un certain nombre de réactions restent intracellulaire. Siddique *et al.* (2006) ont étudié la biodégradation des alcanes à courtes chaînes (C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>8</sub> et C<sub>10</sub>) en conditions méthanogènes (échantillons issus de sablières) et ont montré que la métabolisation de ces composés était intrinsèque. De même, Scheller *et al.* (1998) propose une voie de dégradation des n-alcanes sub-cellulaire (réticulum endoplasmique et peroxisome) en Acetyl CoA chez la levure *Candida maltosa*.**

Molécule parente	N°CAS	Toxicité des molécules parentes						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites						Site cellulaire	Références
		PNEC aqu µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité (UE)	BCF mesuré ou estimé					PNEC aqu µg/l (calcul)	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité (UE)	BCF mesuré ou estimé		
Ethane Etat à 25°C : gazeux S eau à 20°C : 4,7 ml/100ml P vapeur à 20°C : 3850 kPa Log Kow : 1,81	74-840	ND	Non classé	Non classé	Non valide car gaz	ND	1,15-1,79 non accumulable	<i>Pseudomonas methanica</i>	Cooxydation avec méthane Gaz initial composé de 5% d'éthane 45% méthane 50% air	Acide acétique (69% radioactivité récupérée) Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible P vapeur à 20°C : 1,5 kPa Log Kow : -0,31	64-19-7	59	Non classé	Non classé	3530	Faible	3,2	intracellulaire	Perry, 1979
										Ethanol Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible P vapeur à 20°C : 5,8 kPa Log Kow : -0,32	64-17-5	1000	3	Non classé	7060	Non toxique	3	intracellulaire	
										Acétaldéhyde Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible P vapeur à 20°C : 101 kPa Log Kow : 0,63	75-07-0	30,8	Non classé	Cat 3	671	Nocif	3	intracellulaire	
										CO <sub>2</sub> Etat à 25°C : gazeux Solubilité eau (20°C): 88ml/100ml P vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : ??	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat	22,5	extracellulaire		
Propane Etat à 25°C : gazeux S eau à 20°C : 0,007ml/100ml P vapeur à 20°C : 840 kPa Log Kow : 2,36	74-986	ND	Non classé	Non classé	Non valide car gaz	ND	1,56-1,78 non accumulable	<i>Pseudomonas methanica</i>	Cooxydation avec méthane Gaz initial composé de 30% de propane 40% méthane 30% air	Acide propionique Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible P vapeur à 20°C : 390 kPa Log Kow : 0,33	79-09-4	59	Non classé	Non classé	2600	Faible	3,2	intracellulaire	Perry, 1979
										1-Propanol Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible Pression vapeur à 20°C : 2 kPa Log Kow : 0,25	71-23-8	3100	Non classé	Non classé	1870	Nocif	0,7	intracellulaire	
										Acétone Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible P vapeur à 20°C : 24 kPa Log Kow : -0,24	67-64-1	21000	Non classé	Non classé	> 5000	Non toxique	0,69 (poisson)	intracellulaire	
										CO <sub>2</sub> Etat à 25°C : gazeux Solubilité eau (20°C): 88ml/100ml P vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : ??	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat	22,5	extracellulaire		
Butane Etat à 25°C : gazeux S eau à 20°C : 0,006ml/100ml P vapeur à 21,1°C : 213,7 kPa Log Kow : 2,89	106-978	ND	Non classé	Non classé	Non valide car gaz	ND	33 accumulable modérément	<i>Pseudomonas methanica</i>	Cooxydation avec méthane Pas de données expérimentales fournies	Acide butyrique Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): miscible P vapeur à 20°C : 57 kPa Log Kow : 0,79	107-92-6	16,9	Non classé	Non classé	8790	Non toxique	2,3	intracellulaire	Perry, 1979
										1-Butanol Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): 7,7g/100ml P vapeur à 20°C : 0,58 kPa Log Kow : 0,9	71-36-3	1730	3	Non classé	790	Nocif	3	intracellulaire	
										2-Butanone Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): 29g/100ml P vapeur à 20°C : 10,5 kPa Log Kow : 0,29	78-93-3	3426	3	Non classé	2900	Faible	1	intracellulaire	
Pentane Etat à 25°C : liquide S eau à 20°C : aucune P vapeur à 18,5°C : 53,3 kPa Log Kow : 3,39	109-660	9,7 calcul	Non classé	Non classé	400	Nocif	80 accumulable modérément	<i>Arthrobacter sp.</i>	Oxydation aérobie (batch) T = 28°C, pH = 5,7-6,2 pentane = 10 % (v/v) 95 % dégradé en 42j	??	??						Ionata <i>et al</i> , 2005		

Molécule parente	N°CAS	Toxicité des molécules parentes						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites						Site cellulaire	Références
		PNEC aqu µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité (UE)	BCF mesuré ou estimé					PNEC aqu µg/l (calcul)	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité (UE)	BCF mesuré ou estimé		
Octane Etat à 25°C : liquide S eau à 20°C : aucune P vapeur à 20°C : 1,33 kPa Log Kow : 4-5,18	111-659	0,38 calcul	Non classé	Non classé	428	Nocif	1900 accumulable	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Oxydation aérobie (batch) T = 23°C octane = 1 % (v/v)	1-Octanol Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): 0,3 mg/l P vapeur à 8,5°C : 20 Pa Log Kow : 3	111-87-5	13,4	Non classé	Non classé	1790	Nocif	1,25	intracellulaire	Schaeffer <i>et al.</i> , 1979
										1-Octanal Etat à 25°C : liquide Solubilité eau (20°C): faible P vapeur à 25°C : 0,2 kPa Log Kow : ??	124-13-0	ND	Non classé	Non classé	3730	Faible	17	intracellulaire	
										Octanoate	124-07-2	57	Non classé	Non classé	> 5000	Non toxique	120	intracellulaire	
										Octanoyl-CoA	??							intracellulaire	
Hexadécane (mélange d'alcane) Etat à 25°C : liquide S eau à 20°C : aucune P vapeur à 105°C : 0,133 kPa Log Kow : 8,25	544-763	ND	Non classé	??	9821	Faible	6,04 accumulable modérément	<i>Acinetobacter sp.</i>	Oxydation aérobie (batch) T = 25°C, pH = 6,5 alcane = 1 % (p/v) 93 % dégradé en 48h	1-Hexadécanol Etat à 25°C : solide (cristaux) Solubilité eau (20°C): ?? P vapeur à 20°C <0,13 kPa Log Kow : ??	36653-82-4	ND	Non classé	Non classé	> 5000	Non toxique	17000 (algue)	intracellulaire	Koma <i>et al.</i> , 2001
										Ac hexadécanoïque Etat à 25°C : solide (cristaux) Solubilité eau (20°C): aucune P vapeur à 154°C : 133 Pa Log Kow : 5,31	57-10-3	ND	Non classé	Non classé	> 5000	Non toxique	166000		
Hexadécane marqué <sup>14</sup> C Etat à 25°C : liquide S eau à 20°C : aucune P vapeur à 105°C : 0,133 kPa Log Kow : 8,25	544-763	ND	Non classé	??	9821	Faible	6,04 accumulable modérément	<i>AK-01 Protéobactérie</i>	Voie anaérobie (+ SO <sub>4</sub> ) T = 26-28°C 91 % dégradé en 78j	CO <sub>2</sub> Etat à 25°C : gazeux Solubilité eau (20°C): 88ml/100ml P vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : ??	124-38-9	20	Non classé	Non classé??	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat		22,5	extracellulaire	So et Young, 1999
										H <sub>2</sub> S Etat à 25°C : gazeux Solubilité eau (20°C): 4 g/l P vapeur à 20°C : 1874 kPa Log Kow : ??	7783-06-4	0,86 s/s forme sels	Non classé	Non classé	53 (souris) s/s forme sels	Toxique	ND	??	

ND Non déterminé; PNEC Previsible Non Effect Concentration ; BCF Facteur de bioaccumulation ; ?? pas de donnée trouvée

Sources : HSDB, INERIS, Inchem, Google

**Tableau 10.** (Eco)toxicité des alcanes et de leurs produits de biodégradation

## 7. A retenir

La plupart des alcanes (excepté l'hexane dont les effets clastogènes et embryotoxiques ont été rapportés par l'INRS) ne possède pas de propriétés carcinogènes, mutagènes ou tératogènes. Durant leur métabolisation chez l'homme, les alcanes subissent sur leur squelette hydrocarboné, une réaction de fonctionnalisation, les transformant en alcools, moins lipophiles et plus hydrophiles d'où le faible risque de stockage dans les compartiments lipidiques des organismes. L'exemple de l'hexane n'a pas pu aboutir à des informations précises sur sa métabolisation dans les sols par manque de travaux.

### Dégradation aérobie :

Cas des alcanes linéaires : Seulement quelques bactéries ont la capacité de croître sur les alcanes plus courts que le n-octane alors que les n-alcanes dont le nombre de carbone est supérieur à 9, sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables par une très grande variété de microorganismes. **La première étape dans la dégradation aérobie des alcanes par les bactéries, levures et champignons, est catalysée par des oxygénases et aboutit à la formation de composés peu toxiques.**

Cas des alcanes cycliques : Peu d'espèces sont capables d'utiliser les cycloalcanes comme source seule de carbone ; la façon la plus commune consiste en un cométabolisme par des cultures mixtes. Il en résulte une multitude de dérivés cétoniques.

### Dégradation anaérobie :

Le principe biochimique du métabolisme anaérobie des alcanes est encore peu connu. L'attaque initiale n'inclut pas d'étape oxygène-dépendante, mais suppose un couplage à un métabolite cellulaire (toluène succinate par exemple).

### Etudes de terrain :

Les études en laboratoire concernant les alcanes seuls sont faites d'une part pour tester de nouvelles souches de microorganismes biodégradantes ou pour de nouvelles techniques de traitement des sites et sols pollués. L'étude de leur devenir dans les sols n'est jamais traitée dans les travaux de manière explicite du fait de leur présence dans les solvants pétroliers. Les cas de terrain sont rarement documentés et ils traitent le plus souvent d'un mélange de HAP et d'alcanes pour lesquels principalement est prise en compte la dégradation des HAP.

### (Eco)toxicité des métabolites :

La plupart des travaux montrent un potentiel de dégradation existant pour les molécules à longue chaîne carbonée et identifient les micro-organismes impliqués dans ces voies chimiques. **Les métabolites obtenus en laboratoire sont des composés d'acides gras, des acides et d'alcool ayant une toxicité moindre voire inexistante (non classé par l'IARC, DL50 orale > 1000 mg/Kg).**

*Le manque de travaux et de données expérimentales ne permet pas d'aboutir à des fiches synthétiques complètes des voies de dégradation comme pour les HAP et solvants chlorés. De plus, concernant la réactivité des métabolites avec les constituants du sol, aucune remarque ne peut être avancée, d'une part, car les métabolites sont pour la plupart intracellulaires et d'autre part, du fait du manque de données sur les produits excrétés.*

## **8. Références bibliographiques sur la biodégradation des alcanes**

**NB les références indiquées sont celles citées dans le document et ne représente qu'une partie de la bibliographie réunie pour l'étude**

11- Ionata E, De Blasio P, La Cara F., 2005, Microbiological degradation of pentane by immobilized cells of *Arthrobacter sp.*, *Biodegradation*. 16(1):1-9.

The increasing production of several plastics such as expanded polystyrene, widely used as packaging and building materials, has caused the release of considerable amounts of pentane employed as an expanding agent. Today many microorganisms are used to degrade hydrocarbons in order to minimize contamination caused by several industrial activities. The aim of our work was to identify a suitable microorganism to degrade pentane. We focused our attention on a strain of *Arthrobacter sp.* which in a shake-flask culture produced 95% degradation of a 10% mixture of pentane in a minimal medium after 42 days of incubation at 20 degrees C. *Arthrobacter sp.* cells were immobilized on a macroporous polystyrene particle matrix that provides a promising novel support for cell immobilization. The method involved culturing cells with the expanded polystyrene in shake-flasks, followed by *in situ* growth within the column. Scanning electron microscopy analysis showed extensive growth of *Arthrobacter sp.* on the polymeric surface. The immobilized microorganism was able to actively degrade a 10% mixture of pentane, allowing us to obtain a bioconversion yield of 90% after 36 h. Moreover, in repeated-batch operations, immobilized *Arthrobacter sp.* cells were able to maintain 85-95% pentane degradation during a 2 months period. Our results suggest that this type of bioreactor could be used in pentane environmental decontamination.

12- Gonçalves RAC, André A, Porto L. M., Pinheiro L, Cagnon José R., Manfio Gilson P., Marsaioli Anita J., 2004, Multibioreaction Methodology for Baeyer-Villiger Monooxygenase Monitoring, *Food Technol. Biotechnol.* 42 (4) 355–361.

Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO) activity was monitored using traditional biocatalytic methods and also using a multibioreaction approach. The prochiral ketones 4-methyl- cyclohexanone and 3-hexyl-cyclobutanone, among others, were used in screening for BVMO in several microorganisms, leading to the selection of *Geotrichum candidum* CCT 1205, *Aspergillus oryzae* CCT 0975, *Curvularia lunata* CCT 5629, *Aspergillus niger* CCT 5559, *Trichoderma sp.* CCT 5551, *Cunninghamella echinulata* CCT 4424 and *Cunninghamella echinulata* CCT 4259 as good candidates for further BVMO investigations. Additionally, a multibioreaction methodology was used to confirm the presence of BVMO, an activity previously detected by a rapid fluorescence methodology. It was therefore possible to confirm the presence of a BVMO, more precisely a cyclohexanone monooxygenase (CHMO) and also to reveal the presence of an alkene monooxygenase in *Trichosporum cutaneum* CCT 1903.

13- Peter Rapp and Lotte H. E. Gabriel-Jürgens, 2003, Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus sp.* and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase *Microbiology* 149, 2879-2890.

*Rhodococcus sp.* strain MS11 was isolated from a mixed culture. It displays a diverse range of metabolic capabilities. During growth on 1,2,4-trichlorobenzene, 1,2,4,5-tetrachlorobenzene (1,2,4,5-TeCB) and 3-chlorobenzoate stoichiometric amounts of chloride were released. It also utilized all three isomeric dichlorobenzenes and 1,2,3-trichlorobenzene as the sole carbon and energy source. Furthermore, the bacterium grew well on a great number of n-alkanes ranging from n-heptane to n-triacontane and on the branched alkane 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) and slowly on n-hexane and n-pentatriacontane. It was able to grow at temperatures from 5 to 30 °C, with optimal growth at 20 °C, and could tolerate 6 % NaCl in mineral salts medium. Genes encoding the initial chlorobenzene dioxygenase were detected by using a primer pair that was designed against the -subunit (TecA1) of the chlorobenzene dioxygenase of *Ralstonia* (formerly *Burkholderia*) *sp.* strain PS12. The amino acid sequence of the amplified part of the -subunit of the chlorobenzene dioxygenase of *Rhodococcus sp.* strain MS11 showed >99 % identity to the -subunit of the chlorobenzene dioxygenase from *Ralstonia sp.* strain PS12 and the parts of both -subunits responsible for substrate specificity were identical. The subsequent enzymes dihydrodiol dehydrogenase and chlorocatechol 1,2-dioxygenase were induced in cells grown on 1,2,4,5-TeCB. During cultivation on

medium-chain-length n-alkanes ranging from n-decane to n-heptadecane, including 1-hexadecene, and on the branched alkane pristane, strain MS11 produced biosurfactants lowering the surface tension of the cultures from 72 to 29 mN m<sup>-1</sup>. Glycolipids were extracted from the supernatant of a culture grown on n-hexadecane and characterized by <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR-spectroscopy and mass spectrometry. The two major components consisted of  $\alpha$ -trehalose esterified at C-2 or C-4 with a succinic acid and at C-2' with a decanoic acid. They differed from one another in that one 2,3,4,2'-trehalosetetraester, found in higher concentration, was esterified at C-2, C-3 or C-4 with one octanoic and one decanoic acid and the other one, of lower concentration, with two octanoic acids. The results demonstrate that *Rhodococcus sp.* strain MS11 may be well suited for bioremediation of soils and sediments contaminated for a long time with di-, tri- and tetrachlorobenzenes as well as alkanes.

14- So, C.M., C.D. Phelps and L.Y. Young. 2003. Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids: Initial reactions by the sulfate-reducer strain HXD3 using stable isotope labeled compounds. Appl. Environ. Microbiol. 69(7):3892-3900.

Strain Hxd3, an alkane-degrading sulfate reducer previously isolated and described by Aeckersberg *et al.* (F. Aeckersberg, F. Bak, and F. Widdel, Arch. Microbiol. 156:5-14, 1991), was studied for its alkane degradation mechanism by using deuterium and <sup>13</sup>C-labeled compounds. Deuterated fatty acids with even numbers of C atoms (C-even) and <sup>13</sup>C-labeled fatty acids with odd numbers of C atoms (C-odd) were recovered from cultures of Hxd3 grown on perdeuterated pentadecane and [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]hexadecane, respectively, underscoring evidence that C-odd alkanes are transformed to C-even fatty acids and vice versa. When Hxd3 was grown on unlabeled hexadecane in the presence of [<sup>13</sup>C]bicarbonate, the resulting 15:0 fatty acid, which was one carbon shorter than the alkane, incorporated a <sup>13</sup>C label to form its carboxyl group. The same results were observed when tetradecane, pentadecane, and perdeuterated pentadecane were used as the substrates. These observations indicate that the initial attack of alkanes includes both carboxylation with inorganic bicarbonate and the removal of two carbon atoms from the alkane chain terminus, resulting in a fatty acid one carbon shorter than the original alkane. The removal of two terminal carbon atoms is further evidenced by the observation that the [1,2-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>]hexadecane-derived fatty acids contained either two <sup>13</sup>C labels located exclusively at their acyl chain termini or none at all. Furthermore, when perdeuterated pentadecane was used as the substrate, the 14:0 and 16:0 fatty acids formed both carried the same numbers of deuterium labels, while the latter was not deuterated at its carboxyl end. These observations provide further evidence that the 14:0 fatty acid was initially formed from perdeuterated pentadecane, while the 16:0 fatty acid was produced after chain elongation of the former fatty acid with nondeuterated carbon atoms. We propose that strain Hxd3 anaerobically transforms an alkane to a fatty acid through a mechanism which includes subterminal carboxylation at the C-3 position of the alkane and elimination of the two adjacent terminal carbon atoms.

15- van Beilen, J. B., Z. Li, W. A. Duetz, T. H. M. Smits, and B. Witholt. 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci. Technol. Rev. IFP 58:427-440.

The first step in the aerobic degradation of alkanes by bacteria, yeasts, and fungi is catalyzed by oxygenases. These enzymes, which introduce oxygen atoms derived from molecular oxygen into the alkane substrate, play an important role in oil bioremediation and in the cometabolic degradation of compounds such as trichloroethylene and fuel oxygenates. In addition, they are useful biocatalysts and important models for a difficult chemical reaction: the regio- and stereospecific activation of C-H bonds. Several unrelated enzyme classes catalyze the oxidation of alkanes. Alkane-degrading yeast strains contain multiple alkane hydroxylases belonging to the P450 superfamily, while many bacteria contain enzymes related to the *Pseudomonas putida* GPo1 membrane-bound alkane hydroxylase system. Short-chain alkanes are probably oxidized by alkane hydroxylases related to the soluble and particulate methane monooxygenases. Only the membrane-bound enzymes have been studied with respect to their prevalence in environments such as soils or aquifers.

16- Whyte, L. G., T. H. M. Smits, D. Labbé, B. Witholt, C. W. Greer, and J. B. van Beilen. 2002. Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. Appl. Environ. Microbiol. 68:5933-5942.

The alkane hydroxylase systems of two *Rhodococcus* strains (NRRL B-16531 and Q15, isolated from different geographical locations) were characterized. Both organisms contained at least four alkane monooxygenase gene homologs (alkB1, alkB2, alkB3, and alkB4). In both strains, the alkB1 and alkB2 homologs were part of alk gene clusters, each encoding two rubredoxins (rubA1 and rubA2; rubA3

and rubA4), a putative TetR transcriptional regulatory protein (alkU1; alkU2), and, in the alkB1 cluster, a rubredoxin reductase (rubB). The alkB3 and alkB4 homologs were found as separate genes which were not part of alk gene clusters. Functional heterologous expression of some of the rhodococcal alk genes (alkB2, rubA2, and rubA4 [NRRL B-16531]; alkB2 and rubB [Q15]) was achieved in *Escherichia coli* and *Pseudomonas* expression systems. *Pseudomonas* recombinants containing rhodococcal alkB2 were able to mineralize and grow on C(12) to C(16) n-alkanes. All rhodococcal alkane monooxygenases possessed the highly conserved eight-histidine motif, including two apparent alkane monooxygenase signature motifs (LQRH[S/A]DHH and NYXEHYG[L/M]), and the six hydrophobic membrane-spanning regions found in all alkane monooxygenases related to the *Pseudomonas putida* GPo1 alkane monooxygenase. The presence of multiple alkane hydroxylases in the two rhodococcal strains is reminiscent of other multiple-degradative-enzyme systems reported in *Rhodococcus*.

17- Koma D, Hasumi F, Yamamoto E, Ohta T, Chung SY, Kubo M., Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp., J Biosci Bioeng. 2001;91(1):94-6.

Microorganisms that degrade long-chain n-paraffins from used car engine oil were isolated from soil. For the screening, a fraction of n-paraffin prepared from car engine oil was applied as the sole carbon source. The strain was identified as *Acinetobacter* sp. The ability of the strain to assimilate long-chain n-paraffins was assessed and characterized. The strain mineralized long-chain n-paraffins (0.1% w/v) in the minimal medium after cultivation for 96 h and also reduced the weight of the waste oil added (1% w/v) by 20% after 72 h without an extracellular biosurfactant. When n-hexadecane was fed as substrate, 1-hexadecanol and 1-hexadecanoic acid were detected as the intermediates by gas chromatography/mass spectrometry. This indicates that the long-chain n-paraffins were metabolized *via* the terminal oxidation pathway of n-alkane.

18- Ehrenreich P., Behrends A., Harder J., Widdel F., 2000, Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria, Archives of Microbiology 173, 58-64.

The capacity of denitrifying bacteria for anaerobic utilization of saturated hydrocarbons (alkanes) was investigated with n-alkanes of various chain lengths and with crude oil in enrichment cultures containing nitrate as electron acceptor. Three distinct types of denitrifying bacteria were isolated in pure culture. A strain (HxN1) with oval-shaped, nonmotile cells originated from a denitrifying enrichment culture with crude oil and was isolated with n-hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>). Another strain (OcN1) with slender, rod-shaped, motile cells was isolated from an enrichment culture with n-octane (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>). A third strain (HdN1) with oval, somewhat pleomorphic, partly motile cells originated from an enrichment culture with aliphatic mineral oil and was isolated with n-hexadecane (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>). Cells of hexane-utilizing strain HxN1 grew homogeneously in the growth medium and did not adhere to the alkane phase, in contrast to the two other strains. Quantification of substrate consumption and cell growth revealed the capacity for complete oxidation of alkanes under strictly anoxic conditions, with nitrate being reduced to dinitrogen.

19- Fritsche, W., and M. Hofrichter. 2000. Aerobic degradation by microorganisms. Bio/Technology 11b:145-167.

20- Chi Ming So et L. Y. Young, 1999, Isolation and Characterization of a Sulfate-Reducing Bacterium That Anaerobically Degrades Alkane, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 65, No. 7, 2969-2976.

An alkane-degrading, sulfate-reducing bacterial strain, AK-01, was isolated from an estuarine sediment with a history of chronic petroleum contamination. The bacterium is a short, nonmotile, non-spore-forming, gram-negative rod. It is mesophilic and grows optimally at pH 6.9 to 7.0 and at a NaCl concentration of 1%. Formate, fatty acids (C<sub>4</sub> to C<sub>16</sub>) and hydrogen were readily utilized as electron donors. Sulfate, sulfite, and thiosulfate were used as electron acceptors, but sulfur, nitrite, and nitrate were not. Phenotypic characterization and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence indicate that AK-01 is most closely related to the genera *Desulfosarcina*, *Desulfonema*, and *Desulfococcus* in the delta subdivision of the class Proteobacteria. It is phenotypically and phylogenetically different from strains Hxd3 and TD3, two previously reported isolates of alkane-degrading, sulfate-reducing bacteria. The alkanes tested to support growth of AK-01 had chain lengths of C<sub>13</sub> to C<sub>18</sub>. 1-Alkenes (C<sub>15</sub> and C<sub>16</sub>) and 1-alkanols (C<sub>15</sub> and C<sub>16</sub>) also supported growth. The doubling time for growth on hexadecane was 3 days, about four times longer than that for

growth on hexadecanoate. Mineralization of hexadecane was indicated by the recovery of  $^{14}\text{CO}_2$  from cultures grown on  $[1-^{14}\text{C}]$ hexadecane. Degradation of hexadecane was dependent on sulfate reduction. The stoichiometric ratio (as moles of sulfate reduced per mole of hexadecane degraded) was 10.6, which is very close to the theoretical ratio of 12.25, assuming a complete oxidation to  $\text{CO}_2$ . Anaerobic alkane degradation by sulfate reducers may be a more widespread phenomenon than was previously thought.

21- Aeckersberg F, Rainey FA, Widdel F., 1998, Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions, Arch Microbiol, 170(5):361-9.

Natural relationships, improvement of anaerobic growth on hydrocarbons, and properties that may provide clues to an understanding of oxygen-independent alkane metabolism were studied with two mesophilic sulfate-reducing bacteria, strains Hxd3 and Pnd3. Strain Hxd3 had been formerly isolated from an oil tank; strain Pnd3 was isolated from marine sediment. Strains Hxd3 and Pnd3 grew under strictly anoxic conditions on n-alkanes in the range of C12-C20 and C14-C17, respectively, reducing sulfate to sulfide. Both strains shared 90% 16 S rRNA sequence similarity and clustered with classified species of completely oxidizing, sulfate-reducing bacteria within the delta-subclass of Proteobacteria. Anaerobic growth on alkanes was stimulated by alpha-cyclodextrin, which served as a non-degradable carrier for the hydrophobic substrate. Cells of strain Hxd3 grown on hydrocarbons and alpha-cyclodextrin were used to study the composition of cellular fatty acids and *in vivo* activities. When strain Hxd3 was grown on hexadecane (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>), cellular fatty acids with C-odd chains were dominant. Vice versa, cultures grown on heptadecane (C<sub>17</sub>H<sub>36</sub>) contained mainly fatty acids with C-even chains. In contrast, during growth on 1-alkenes or fatty acids, a C-even substrate yielded C-even fatty acids, and a C-odd substrate yielded C-odd fatty acids. These results suggest that anaerobic degradation of alkanes by strain Hxd3 does not occur *via* a desaturation to the corresponding 1-alkenes, a hypothetical reaction formerly discussed in the literature. Rather an alteration of the carbon chain by a C-odd carbon unit is likely to occur during activation; one hypothetical reaction is a terminal addition of a C1 unit. In contrast, fatty acid analyses of strain Pnd3 after growth on alkanes did not indicate an alteration of the carbon chain by a C-odd carbon unit, suggesting that the initial reaction differed from that in strain Hxd3. When hexadecane-grown cells of strain Hxd3 were resuspended in medium with 1-hexadecene, an adaptation period of 2 days was observed. Also this result is not in favor of an anaerobic alkane degradation *via* the corresponding 1-alkene.

22- Ulrich Scheller, Thomas Zimmer§, Dörte Becher, Frieder Schauer, and Wolf-Hagen Schunck, 1998, Oxygenation Cascade in Conversion of n-Alkanes to ,-Dioic Acids Catalyzed by Cytochrome P450 52A3 J Biol Chem, Vol. 273, Issue 49, 32528-32534.

Purified recombinant cytochrome P450 52A3 and the corresponding NADPH-cytochrome P450 reductase from the alkane-assimilating yeast *Candida maltosa* were reconstituted into an active alkane monooxygenase system. Besides the primary product, 1-hexadecanol, the conversion of hexadecane yielded up to five additional metabolites, which were identified by gas chromatography-electron impact mass spectrometry as hexadecanal, hexadecanoic acid, 1,16-hexadecanediol, 16-hydroxyhexadecanoic acid, and 1,16-hexadecanedioic acid. As shown by substrate binding studies, the final product 1,16-hexadecanedioic acid acts as a competitive inhibitor of n-alkane binding and may be important for the metabolic regulation of the P450 activity. Kinetic studies of the individual sequential reactions revealed high  $V_{\text{max}}$  values for the conversion of hexadecane, 1-hexadecanol, and hexadecanal (27, 23, and 69  $\text{min}^{-1}$ , respectively), whereas the oxidation of hexadecanoic acid, 1,16-hexadecanediol, and 16-hydroxyhexadecanoic acid occurred at significantly lower rates (9, 9, and 5  $\text{min}^{-1}$ , respectively). 1-Hexadecanol was found to be the main branch point between mono- and diterminal oxidation. Taken together with data on the incorporation of  $^{18}\text{O}_2$ -derived oxygen into the hexadecane oxidation products, the present study demonstrates that a single P450 form is able to efficiently catalyze a cascade of sequential mono- and diterminal monooxygenation reactions from n-alkanes to ,-dioic acids with high regioselectivity.

23- Irwin RJ, 1997, Environmental contaminants encyclopedia. Alkanes entry. National park service, Fort Collins, Colorado.

24- Inchem, 1991, Environmental Health Criteria 122, n-Hexane, *disponible en ligne*

25- A K Koch, O Käppeli, A Fiechter and J Reiser, 1991, Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J Bacteriol. 173(13): 4212-4219

We isolated transposon Tn5-GM-induced mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PG201 that were unable to grow in minimal media containing hexadecane as a carbon source. Some of these mutants lacked extracellular rhamnolipids, as shown by measuring the surface and interfacial tensions of the cell culture supernatants. Furthermore, the concentrated culture media of the mutant strains were tested for the presence of rhamnolipids by thin-layer chromatography and for rhamnolipid activities, including hemolysis and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. Mutant 65E12 was unable to produce extracellular rhamnolipids under any of the conditions tested, lacked the capacity to take up <sup>14</sup>C-labeled hexadecane, and did not grow in media containing individual alkanes with chain lengths ranging from C12 to C19. However, growth on these alkanes and uptake of [<sup>14</sup>C]hexadecane were restored when small amounts of purified rhamnolipids were added to the cultures. Mutant 59C7 was unable to grow in media containing hexadecane, nor was it able to take up [<sup>14</sup>C]hexadecane. The addition of small amounts of rhamnolipids restored growth on alkanes and [<sup>14</sup>C]hexadecane uptake. In glucose-containing media, however, mutant 59C7 produced rhamnolipids at levels about twice as high as those of the wild-type strain. These results show that rhamnolipids play a major role in hexadecane uptake and utilization by *P. aeruginosa*.

26- Perry J J, 1979, Microbial cooxidations involving hydrocarbons. Microbiol Rev. 43(1): 59-72.

27- Schaeffer T L, Cantwell S G, Brown J L, Watt D S et Fall R R, 1979, Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. Appl Environ Microbiol. 38(4): 742-746.

A variety of octane-utilizing bacteria and fungi were screened for growth on some terminally branched dimethyloctane derivatives to explore the effects of iso- and anteiso-termini on the biodegradability of such hydrocarbons. Of 27 microbial strains tested, only 9 were found to use any of the branched hydrocarbons tested as a sole carbon source, and then only those hydrocarbons containing at least one iso-terminus were susceptible to degradation. Anteiso- or isopropenyl termini prevented biodegradation. None of the hydrocarbonoclastic yeasts tested was able to utilize branched-hydrocarbon growth substrates. In the case of pseudomonads containing the OCT plasmid, whole-cell oxidation of n-octane was poorly induced by terminally branched dimethyloctanes. In the presence of a gratuitous inducer of the octane-oxidizing enzymes, the iso-branched 2,7-dimethyloctane was slowly oxidized by whole cells, whereas the anteiso-branched 3,6-dimethyloctane was not oxidized at all. This microbial sampling dramatically illustrated the deleterious effect of alkyl branching, especially anteiso-terminal branching, on the biodegradation of hydrocarbons.

28- R Olivieri, P Bacchin, A Robertiello, N Oddo, L Degen and A Tonolo, 1976, Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer, Appl Environ Microbiol. 31(5): 629-634.

The improved cleanup of marine oil spills by stimulating biodegradation through the use of a slow-release fertilizer is reported. A paraffin-supported fertilizer containing MgNH<sub>4</sub>PO<sub>4</sub> as active ingredient was developed and evaluated in laboratory and field experiments using quantitative infrared spectrometry and chromatographic techniques. The biodegradation of Sarir crude oil in the sea was considerably enhanced by paraffin-supported fertilizer. After 21 days 63% had disappeared as compared to 40% in the control area.

29- Walker J. D. et Cooney J. J., 1973, Pathway of n-Alkane Oxidation in *Cladosporium resinae*, J Bacteriol. 115(2): 635-639

Pathways of initial oxidation of n-alkanes were examined in two strains of *Cladosporium resinae*. Cells grow on dodecane and hexadecane and their primary alcohol and monoic acid derivatives. The homologous aldehydes do not support growth but are oxidized by intact cells and by cell-free preparations. Hexane and its derivatives support little or no growth, but cell extracts oxidize hexane, hexanol, and hexanal. Alkane oxidation by extracts is stimulated by reduced nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate). Alcohol and aldehyde oxidation are stimulated by nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate), and reduced coenzymes accumulate in the presence of cyanide or azide. Extracts supplied with <sup>14</sup>C-hexadecane convert it to the alcohol, aldehyde, and acid. Therefore, the major pathway for initial oxidation of n-alkanes is *via* the primary alcohol, aldehyde, and monoic acid, and the system can act on short-, intermediate-, and long-chain substrates. Thus, filamentous fungi appear to oxidize n-alkanes by pathways similar to those used by bacteria and yeasts.

30- Bird C. W. et Molton P., 1969, The biochemical status of metabolites of alkane-utilizing Pseudomonas organisms, Biochem J. 114(4): 881-884.

**VII. LES HYDROCARBURES**  
**AROMATIQUES**  
**POLYCYCLIQUES**

## 1. Caractéristiques physico-chimiques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) forment un groupe vaste de composés. Ils se présentent le plus souvent sous forme de mélanges complexes. C'est pourquoi, d'un point de vue réglementaire, l'US EPA a retenu 16 substances essentiellement prises en compte dans l'analyse des données toxicologiques et environnementales (cf tableau 11).

Les HAP sont des molécules formées par la fusion de plusieurs noyaux benzéniques (2 à 6 cycles), à configuration linéaire ou angulaire, dont il existe environ 70 isomères possibles. Plus ou moins stables selon leur configuration (les molécules linéaires sont les moins stables) et leurs propriétés physico-chimiques, ce sont des molécules de taille importante (masse moléculaire = [128,2 – 278,4]) hydrophobes et très lipophiles (log Kow = [3,4 – 7,2]) (Simonich et Hites, 1995).

Parmi les 16 HAP de la liste établie par l'US-EPA, quatre sont volatiles (pression de vapeur élevée à 25°C) ; ce sont le naphthalène, l'acénaphthène, l'acénaphthylène et le fluorène.

Nom	N°CAS	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau mg/l à 25°C	Log Kow	Log Koc	Tension de vapeur Pa à 25°C	Point de Fusion (°C) s/s 1 atm	Point d'Ebullition (°C) s/s 1 atm
Naphtalène	91-203	128,2	32	3,3	3,15	10,5	80	218
Acénaphthylène	208-968	152,2	3,93	4,07	1,4	0,89	96	279
Acénaphthène	83-329	154,2	3,7	3,92	3,66	0,356	92	279
Fluorène	86-737	166,2	1,98	4,18	3,9	9.10 <sup>-2</sup>	216	215
Phénanthrène	85-018	178,2	1,2	4,57	3,16	0,091	101	340
Anthracène	120-127	178,2	1,29	4,45	4,41	3,6.10 <sup>-4</sup>	116	340
Fluoranthène	206-440	202,3	0,26	5,1	4,86	1,2.10 <sup>-3</sup>	111	375
Pyrène	129-000	202,3	0,13	5,32	4,86	1,2.10 <sup>-2</sup>	158	404
Benzo(a) Anthracène	56-553	228,3	0,0057	5,61	5,3	2,6.10 <sup>-5</sup>	255	400
Chrysène	218-019	228,3	0,002	5,16	5,12	8,4.10 <sup>-5</sup>	149	448
Benzo(b) Fluoranthène	205-992	252,3	0,012	6,57	5,18	6,7.10 <sup>-5</sup>	179	481
Benzo(k) Fluoranthène	207-089	252,3	0,0008	6,84	5,90	1,3.10 <sup>-8</sup>	167	480
Benzo(a)pyrène	50-328	252,3	0,0038	6,06	6,74	7,3.10 <sup>-7</sup>	217	475
Dibenzo(ah) Anthracène	53-703	278,3	0,0005	6,70	6,15	1,3.10 <sup>-8</sup>	262	524
Benzo(ghi) Pérylène	191-242	276,3	2,6.10 <sup>-4</sup>	6,5	4,98	1,3.10 <sup>-8</sup>	222	550
Indéno(123cd) Pyrène	193-395	276,3	0,062	6,18	6,8	1,3.10 <sup>-8</sup>	163	533

**Tableau 11.** Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires (d'après les fiches INERIS disponibles sur [www.ineris.fr](http://www.ineris.fr) )

Les caractéristiques communes des HAP sont : des points de fusion et d'ébullition élevés, une solubilité dans l'eau très faible. Cette dernière diminue lorsque le poids moléculaire augmente. Les HAPs présentent également des coefficients de partage octanol/eau très élevés. Ces composés sont donc lipophiles et solubles dans de nombreux solvants organiques. Ainsi, ils sont potentiellement bioaccumulés et concentrés dans les sédiments et les sols ainsi que dans les organismes.

**La persistance des HAPs augmente avec le nombre de cycles de la molécule.** Par exemple, le naphtalène et les composés de faible poids moléculaire, étant plus solubles et plus volatiles sont peu persistants et donc peu bioaccumulables (Kanaly et Harayama, 2000). En revanche, les **composés de poids moléculaires élevés sont très persistants et par conséquent bioaccumulables.**

Par exemple, la demi-vie dans les sols du benzo[k]fluoranthène est de plusieurs années (jusqu'à 9 selon les sources) alors que celle du fluoranthène est de 1 à 2 mois. Le tableau 12 récapitule les demi-vies de plusieurs HAP dans les sols.

<b>Nom</b>	<b>Sols Milieu Aérobie</b>	<b>Sols Milieu Anaérobie</b>
	Domaine de variation (jours)	
Naphtalène	0,21-766	25-258
Acénaphthylène	42,5-60	170-240
Acénaphthène	0,30-102	33-408
Fluorène	2-71	34-240
Phénanthrène	0,61-5475	2,6-800
Anthracène	2,72-2920	38,5-1840
Fluoranthène	44-6205	560-1760
Pyrène	3-6570	15,8-7600
Benzo(a) Anthracène	4-7220	270-2720
Chrysène	5,5-1900	180-4000
Benzo(b) Fluoranthène	113-9855	228-2120
Benzo(k) Fluoranthène	132-3175	1440-2440
Benzo(a)pyrène	2-9490	1444-3760
Dibenzo(ah) Anthracène	18-12940	3640-8560
Benzo(ghi) Pérylène	340-9125	2360-2600
Indéno(123cd) Pyrène	224-3130	2400-2920

**Tableau 12.** Demi-vies des HAP par biodégradation dans le sol (INERIS, 2005)

Les valeurs varient suivant les auteurs, mais dans tous les cas, **les demi-vies de biodégradation des HAP de plus de quatre cycles augmentent considérablement (> 20 jours à des centaines de jours).** En effet, la biodégradabilité est fonction du coefficient de partage octanol/eau : plus il est important et moins le composé sera biodégradable.

Cependant les HAP de plus de cinq cycles peuvent être co-métabolisés (Juhász et Naidu, 2000 ; Kanaly et Harayama, 2000).

## 2. Caractéristiques (éco)toxiques

Le principal risque que présentent les HAP sur la santé, est leur capacité pour certains à induire le développement de cancer dans les organismes exposés (Bernal-Martinez, 2005).

L'induction du cancer chez les mammifères suite à l'exposition aux HAPs passe par la participation d'un groupe d'enzymes capables de transformer les composés xénobiotiques initiaux en produits solubles dans l'eau. Ces enzymes sont des mono oxygénases qui appartiennent au groupe cytochrome P450. Les HAPs sont transformés en HAPs diol-époxyde qui sont alors particulièrement réactif avec l'ADN, l'ARN et les protéines cellulaires, créant ainsi de nombreuses mutations irréversibles et pouvant induire la formation de tumeur.

La capacité d'expression de ces enzymes P450 dépend de chaque organisme. Les mammifères par exemple, ont une grande aptitude d'adaptation à ces agents mutagènes et, une exposition chronique aux HAPs provoque à terme la production d'anticorps dégradant les composés lipophiles persistants. En revanche, les poissons ont une capacité limitée de dégradation (Sutherland *et al.*, 1995).

Le benzo[a]pyrène est potentiellement le plus cancérigène (Phillips, 1983). D'autres HAPs sont également reconnus comme étant fortement génotoxiques et/ou cancérigènes, comme le fluoranthène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le chrysène, le benzo[g,h,i]pérylène et l'indéno[123cd]pyrène (Feix et Wiart, 1995). **Il est à noter que le caractère génotoxique est lié à la taille des molécules, les HAP lourds (ou de plus de 4 cycles), excepté le B(a)A et le B(ghi)pérylène, sont classés comme cancérigènes par l'IARC (cf tableau 13).**

Nature chimique	Formule	Classement UE	Classement CIRC/IARC	Classement US EPA
Naphtalène	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	nc	2B	C
Acénaphtylène	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub>	nc		D
Acénaphène	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub>	nc		
Fluorène	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	nc	3	D
Phénanthrène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	nc	3	D
Anthracène	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	nc	3	D
Fluoranthène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	nc	3	D
Pyrène	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	nc	3	D
Benzo(a)anthracène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	2	2A	B2
Chrysène	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub>	2	3	B2
Benzo(b)fluoranthène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	2	2B	B2
Benzo(k)fluoranthène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	nc	2B	B2
Benzo(a)pyrène	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub>	2	2A	B2
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	nc	2B	B2
Dibenzo(ah)anthracène	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub>	2	2A	B2
Benzo(ghi)pérylène	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>	nc	3	D

nc : Non cancérigène ; 2 : Substances devant être assimilées à des substances mutagènes pour l'Homme

2A : Probablement cancérigène pour l'Homme ; 2B Possiblement cancérigène pour l'Homme ; 3 ne peut être classé cancérigène

B1 et B2 : Cancérigène probable pour l'Homme ; C : Cancérigène possible pour l'Homme ; D : Inclassable

**Tableau 13.** Cancérogénicité des 16 principaux HAP dans Doornaert et Pichard (2003)

La plupart des études écotoxicologiques sur les HAP ont porté sur des organismes aquatiques plutôt que sur des organismes terrestres. Des effets sont observés sur la survie, la croissance, la reproduction et le déclenchement de néoplasmes après une exposition aux HAP. La gamme étendue des concentrations responsables d'effet (de 0,5 µg/l à 25 mg/l) reflète la diversité des paramètres et des protocoles expérimentaux (tableau 14). Néanmoins, le B(a)P est nettement plus toxique, d'un point de vue aigu ou chronique, que les autres HAP testés.

Composé	Nb de cycles	Ecotoxicité		
		aiguë en µg/l	chronique en µg/l	
		D magna CL50 48h	P subcapitata CE10 72h	C dubia CE10 7j
Anthracène	3	95	7,8	>3,4
Phénanthrène	3	>400	26,4	13,4
Fluorène	3	408	82	25
Fluoranthène	4	408	82	0,017*
Pyrène	4	24600	1200	2100
Benzo(a)Pyrène	5	>2,7	0,78	0,5

\* Valeurs de toxicité du test *D magna* chronique (21j) car valeurs du test *C dubia* non disponibles

**Tableau 14.** Valeurs d'écotoxicité aquatique de quelques HAPs (données disponibles sur le site de l'INERIS)

La mutagénicité des produits de métabolisation des HAP ont été étudiés au moyen du test d'Ames. Le test d'Ames est un test de mutagenèse proprement dit. Il consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*. Les souches utilisées dans le test sont des souches porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Ce test permet de quantifier l'induction de mutations réverses après exposition à une substance mutagène.

Lors de la réalisation du test d'Ames (souches 98 et 100 de *S. typhimurium*) sur quelques HAP de 4 cycles et plus, l'effet mutagène est observé avec S9 soit après activation métabolique (sauf pour le pyrène pour lequel l'effet mutagène est observé sans S9) : les effets les plus importants sont notés pour le benzo(a)pyrène avec 120 révertants/nmol (Kubo *et al.*, 2002). Dans le cas du pyrène, la métabolisation semble avoir un effet bénéfique puisque l'effet mutagène disparaît (les métabolites obtenus sont donc non mutagènes).

### **3. Biodégradation aérobie**

Comme explicité dans le paragraphe 1, **la biodégradation des HAP de plus de 4 cycles est lente** (Kow élevé, 1/2 sols = plusieurs mois voire plusieurs années) dans l'environnement, ce qui rend problématique toute contamination par des dérivés pétroliers riches en composés lourds (ex : naufrage ERIKA).

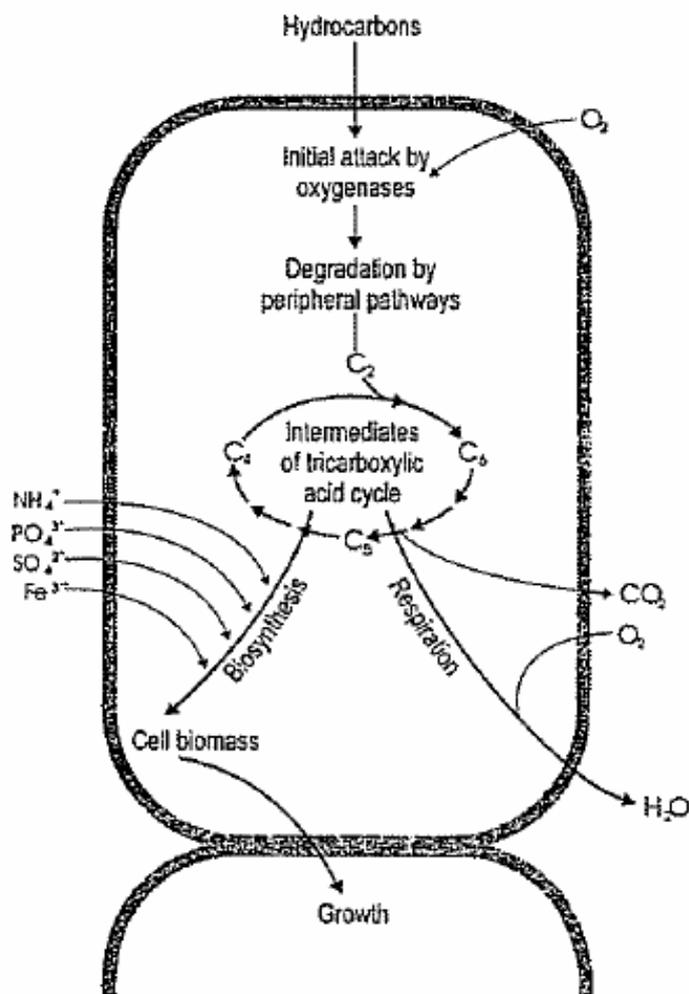
Afin d'être dégradés par les microorganismes, les HAP doivent être dissous (soit ajoutés comme tels, ou désorbés suite à un relargage par un agent surfactant ou d'autres composés extracellulaires, par contact physique des composés hydrophobes à la surface d'un organisme) (Dictor *et al.*, 2003). **De nombreux micro-organismes sont connus comme ayant les enzymes nécessaires à l'oxydation des 4 noyaux aromatiques des HAP.** Certains, tels que *Rhodococcus sp.*, sont capables de dégrader les HAP (pyrène, fluoranthène) *via* un mécanisme d'assimilation.

Une variété de bactéries hétérotrophes a été isolée de divers sols et est capable d'utiliser des HAP à trois noyaux, comme le phénanthrène, comme source de carbone et d'énergie, par exemple *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* (Kiyohara *et al.*, 1982 ; Boldrin *et al.*, 1993 ; Ortega-Calvo et Saiz-Jimenez, 1998). Le principal facteur limitant la biodégradation des HAP est leur biodisponibilité (Ortega-Calvo et Saiz-Jimenez, 1998).

Divers métabolites résultant de la dégradation bactérienne du phénanthrène ont été identifiés. Le 1-hydroxy-2-naphthoate, l'o-phtalate et le protocatchuate sont formés à partir de *Pseudomonas sp.* après meta-clivage (Menn *et al.*, 1993).

**La biodégradation en milieu aérobie est la plus efficace pour « casser » les liaisons des composés aromatiques (Fritsche et Hofrichter, 2000 ; Thiem et Schulze, 2003). Les caractéristiques essentielles de la dégradation des HAP par les microorganismes aérobies sont présentées dans la figure 5 :**

- (1) Les processus métaboliques pour optimiser le contact entre les cellules microbiennes et les polluants organiques initient la dégradation.**
- (2) L'attaque intracellulaire primaire des polluants est un processus oxydatif nécessitant l'activation et l'incorporation d'oxygène : cette réaction clé enzymatique est catalysée par les oxygénases et les peroxydases.**
- (3) Les voies de dégradation périphériques convertissent les polluants organiques étape par étape en produits du métabolisme intermédiaire central, par exemple le cycle de l'acide tri-carboxylique.**
- (4) La biosynthèse des cellules à partir des métabolites précurseurs centraux, par exemple l'acetyl-CoA, succinate, pyruvate, finalisent le processus. Les sucres nécessaires aux biosynthèses variées et à la croissance microbienne sont synthétisés par gluconéogénèse.**



**Figure 5.** Principes généraux de la dégradation aérobie des hydrocarbures : processus associés à la croissance cellulaire (d'après Fritsche et Hofrichter, 2000)

En présence d'oxygène, la biodégradation des HAP diminue avec l'augmentation du poids moléculaire (Cerniglia, 1992) mais l'apport de substances nutritives semble permettre une dégradation cométabolique du benzo(a)pyrène (Juhász et Naidu, 2000). Les réactions aérobies sont les plus énergétiques et dans la majorité des cas, la solubilité de l'oxygène dans l'eau est un facteur limitant. Pour les HAP de faible poids moléculaire, la dégradation biotique est le processus majeur dans les sols et les eaux (Rollin et Quiot, 2005).

Un large panel de bactéries et champignons sont capables de dégrader les HAP. Fritsche et Hofrichter (2000) ont listés les bactéries prédominantes dans les sols pollués appartenant à un large spectre de genres et d'espèces (tableau 15).

Bactéries gram $\ominus$	Bactéries gram $\oplus$
Pseudomonas sp.	Nocardia sp.
Acinetobacter sp.	Mycobacterium sp.
Alcaligenes sp.	Corynebacterium sp.
Flavobacterium / groupe Cytophage	Arthrobacter sp.
Xanthomonas sp.	Bacillus sp.

**Tableau 15.** Principales souches bactériennes aérobies participant à la dégradation des HAP

COMPOSE	MICROORGANISMES	PRODUITS
Naphtalène	<i>Pseudomonas sp</i>	Acide salicylique, catéchol, acide gentisique
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Acide salicylique
	<i>Mycobacterium sp</i>	Acide salicylique, catéchol,
Fluorène	<i>Rhodococcus sp</i>	Acide salicylique, acide gentisique
	<i>Pseudomonas sp</i>	1,1a-dihydroxy-1-9 hydrofluorénone
	<i>Rhodococcus sp</i> et <i>Mycobacterium sp</i>	9-fluorenoI, 9-fluorénone, 1-indanone
Anthracène	<i>Staphylococcus auriculans</i>	4- et 1-hydroxy-9-fluorénone.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Acide salicylique et catéchol
Phénanthrène	<i>Rhodococcus sp</i>	-
	<i>Pseudomonas sp</i>	1,2-dihydroxynaphtalène
Fluoranthène	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> et <i>P. fluorescens</i>	CO <sub>2</sub>
	<i>Pseudomonas paucimobilis</i> et <i>Alcaligenes denitrificans</i>	3-hydroxymethyl-4,5-benzocoumarique
Pyrène	<i>Mycobacterium spp.</i>	CO <sub>2</sub>
Benzo[a]anthracène	<i>Beijerinckia sp</i>	Cis-10,11-dihydrodiol
Chrysène	<i>Rhodococcus sp</i>	
Benzo[a]pyrène	<i>Beijerinckia sp</i>	Cis-7,8-et cis 9,10-dihydrodiols
	<i>Pseudomonas spp</i>	

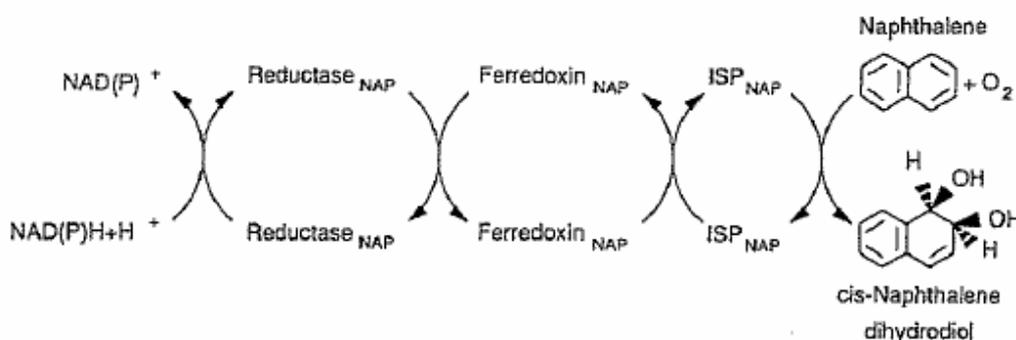
**Tableau 16.** Bactéries prédominantes et métabolites produits dans des échantillons de sols pollués (d'après Fritsche et Hofrichter, 2000)

La plupart des expériences ont été réalisées avec des cultures pures issues d'enrichissement à partir de sols, de sédiments ou d'eaux naturelles. Bernal-Martinez (2005) a résumé les principales souches bactériennes isolées et les produits de dégradation des HAPs sont listés dans le tableau 16.

## \* Biodégradation d'un HAP à 2 cycles : le naphthalène

### 1) Les bactéries

Diverses espèces bactériennes de *Pseudomonas* (*P. putida* PpG7 et NCIB 9816 ; *P. aeruginosa* PAO1) oxydent le naphthalène selon le mécanisme biologique explicité dans la figure 6 (Cerniglia, 1992 ; Eaton et Chapman, 1992) pour aboutir dans un premier temps à un radical cis-dihydrodiol. Le radical cis-dihydrodiol va donner le 1,2-dihydroxynaphtalène qui sera métabolisé en dérivé salicylé. D'autres bactéries sont citées par Cerniglia comme étant à l'origine de l'oxydation du naphthalène, telles que *Acinobacter calcoaceticus*, *Alcaligenes denitrificans*, *Mycobacterium sp.* ou *Rhodococcus sp.*



**Figure 6.** Oxydation du Naphthalène en cis-1,2-dihydrodiol naphthalène par la naphthalène dioxygénase (ISP = protéine sulfo-ferrique)

### 2) Les champignons

Ils sont à l'origine de l'oxydation des HAP : par exemple, le champignon non-ligninolytique *Cunninghamella elegans* utilise le système mono-oxygénase à cytochrome P450 pour incorporer un atome de la molécule d'oxygène dans le noyau aromatique et réduire l'atome restant en eau (Hammel, 1995). D'autres champignons comme *Aspergillus niger* ou *Saccharomyces cerevisiae* peuvent attaquer les noyaux aromatiques.

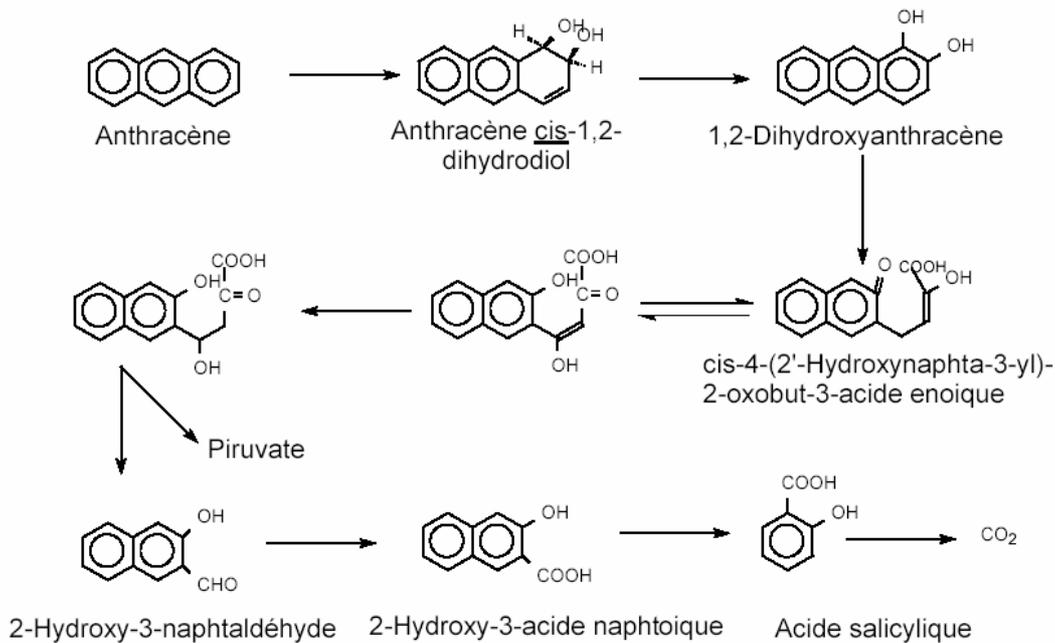
**Les principaux métabolites produits par action des champignons du sol sur le naphthalène sont : (Cerniglia, 1992)**

- **1-et 2-Naphthol,**
- **trans-1,2-dihydrodiol naphthalène,**
- **4-hydroxy-1-tetralone,**
- **1,2-naphthoquinone,**
- **1,4-naphthoquinone,**
- **conjugués sulfates et glucuronide**

**\* Biodégradation des HAPs à 3 cycles : l'acénaphthylène, le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène**

1) Les bactéries

Les HAP à 3 cycles sont métabolisés par les bactéries par action des dioxygénases en composés dihydrodiols puis en acides carboxyliques. L'anthracène est métabolisé par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* en acide salicylique (figure 7).



**Figure 7.** La voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* (d'après Sutherland *et al.*, 1995)

2) Les champignons

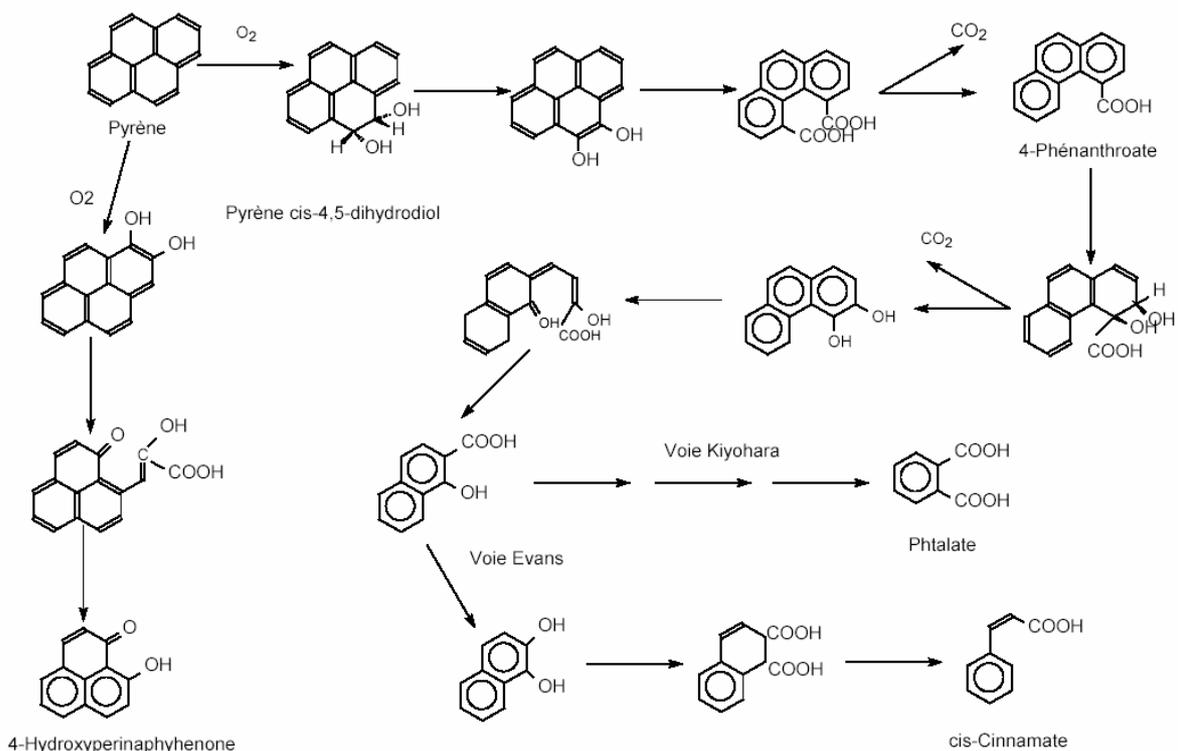
Field *et al.* (1992) ont étudié la biodégradation de l'anthracène par divers isolats de champignons de la pourriture blanche dont *Bjerkandera sp.* avec élimination de plus de 99% (expérimentation en culture avec une concentration initiale de 10 mg/l d'HAP) après 28 jours en présence d'oxygène avec production d'antraquinone comme métabolite final. Ces mêmes auteurs ont montré la dégradation de l'anthracène par *Trametes versicolor* sans accumulation de quinone. En effet, la capacité de *Trametes* à dégrader l'antraquinone a été démontrée dans cette étude.

**\* Biodégradation des HAPs à 4-5 cycles : le fluoranthène, le pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène, le benzo[a]pyrène**

1) Les bactéries

Peu de données existent sur les bactéries qui sont capables de dégrader les HAPs lourds (Juhasz and Naidu, 2000) mais, divers auteurs ont démontré que leurs voies métaboliques ressemblent à celles du naphtalène avec incorporation initiale d'une molécule de dioxygène par une dioxygénase suivie d'une dégradation en chaîne des cycles benzéniques. Le pyrène est ainsi catabolisé par *Mycobacterium spp.* en CO<sub>2</sub> (figure 8) (Heitkamp *et al.*, 1988 ; Boldrin *et al.*, 1993).

Le benzo[a]pyrène est métabolisé avec difficulté, ceci est lié à sa faible solubilité dans l'eau, sa forte énergie de résonance (comparée à celle des autres molécules plus petites) et sa toxicité (Cerniglia, 1992 ; Wild and Jones, 1993). Kelley *et al.* (1993) ont montré que la dégradation du benzo[a]pyrène par *Mycobacterium sp.* en mélange avec six autres HAPs n'est pas complète. *S. paucimobilis* peut toutefois dégrader les HAPs de cinq cycles comme le dibenzo[a,h]anthracène et le benzo[b]fluoranthène avec des rendements respectifs de 7,5% à 33%.



**Figure 8.** La voie aérobie de dégradation bactérienne du Pyrène par *Mycobacterium spp.* (d'après Sutherland *et al.*, 1995)

2) Les champignons

Ceux dits de la pourriture blanche, participent à la dégradation des HAPs en milieu naturel. Les principales espèces (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* et *Bjerkandera sp.*) excrètent les lignines peroxydases dans le milieu, lesquelles créent une double liaison entre un atome de carbone du cycle benzénique et un atome

d'oxygène, formant une quinone (Boyle *et al.*, 1998 ; Harayama, 1997 ; Kotterman *et al.*, 1998 ; Rama-Mercier, 1998). Ces champignons (*Pycnoporus cinnabarinus*, *Bjerkandera adusta* et *Pleurotus ostreatus*) produisent également des laccases (Schützendübel *et al.*, 1999). Sous l'action de l'ensemble de ces enzymes, l'attaque du cycle phénolique par les systèmes enzymatiques est facilitée par la présence d'un groupe réactif (quinone) (Kotterman *et al.*, 1998), ce qui va améliorer leur dégradabilité.

### 3) Autres

Il existe d'autres familles de microorganismes capables de transformer ou dégrader les HAPs. Il a notamment été montré que certaines algues unicellulaires pouvaient métaboliser les plus petits HAPs (naphtalène). De même, Romero *et al.* (1998) ont isolé des souches de levures (*Rhodotorula glutinis*) utilisant le phénanthrène comme seule source de carbone et d'énergie.

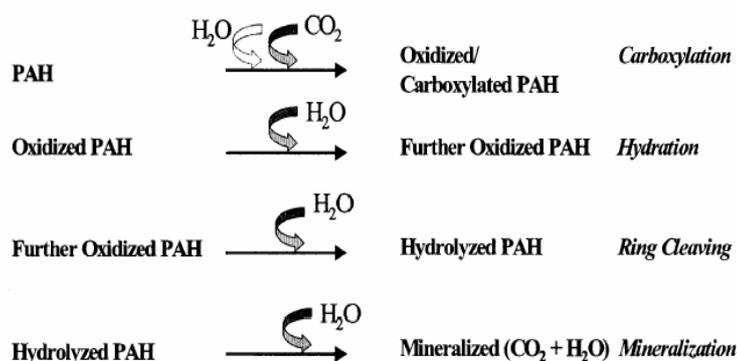
**Néanmoins, le rôle de ces microorganismes dans le catabolisme des HAPs au sein d'écosystèmes complexes reste encore mal connu** (Kirso et Irha, 1998; Semple *et al.*, 1999).

#### 4. Biodégradation anaérobie bactérienne

**La biodégradation des HAPs par voie anaérobie est moins étudiée que la voie aérobie car longtemps considérée comme irréalisable.** Cependant, les récents travaux montrent qu'il y a un potentiel réel des flores anaérobies à dégrader ces composés. Déjà, Cerniglia (1992) suggérait que la biodégradation des HAP nécessitait la présence d'oxygène moléculaire pour initier l'attaque enzymatique des molécules aromatiques. Mais d'autres auteurs ont depuis démontré la dégradation des HAP en présence de nitrates et sulfates comme accepteurs terminaux d'électrons.

Chang *et al.* (2003) ont montré la capacité d'écosystèmes anaérobies à dégrader les HAPs ajoutés seuls ou en mélange en présence de boues urbaines ou industrielles. Un des résultats intéressants est **la supériorité des vitesses de dégradation de chaque HAP lorsqu'ils sont ajoutés en mélange, impliquant un effet stimulant du mélange par rapport à la présence d'un seul HAPs.**

La carboxylation a été proposée comme étape initiale dans la biotransformation des HAP en conditions anaérobies (Meckenstock *et al.*, 2000). D'autres auteurs comme Bedessem *et al.*, (1997) ont proposé l'hydroxylation comme étape initiale de décomposition des HAP en conditions sulfato-réductrices. Ces deux voies de transformation sont présentées dans la figure 9. **En l'absence d'oxygène, le potentiel redox devient un facteur critique dans la métabolisation des HAP par les populations microbiennes présentes dans les sols, sédiments et systèmes aquifères (Karthikeyan et Bhandari, 2001).**



**Figure 9.** Voies de biotransformation des HAP en conditions anaérobies (d'après Karthikeyan et Bhandari, 2001)

**La biodégradation anaérobie est fonction des molécules présentes dans le milieu comme accepteurs d'électrons (nitrate, fer, sulfate, méthane) :**

##### 1) Conditions dénitrifiantes

La voie biochimique de dégradation anaérobie des HAPs a été étudiée ces dernières années en privilégiant surtout le naphthalène. Mihelcic et Luthy, (1988) ont mis en évidence la dégradation du naphthalène et de l'acénaphthène, sous conditions dénitrifiantes en aquifères et sols pollués.

La minéralisation a été confirmée par la production de  $^{14}\text{CO}_2$  à partir de  $^{14}\text{C}$ -naphtalène : près de 90% des HAPs peuvent être minéralisés en  $\text{CO}_2$ , mais aucune donnée n'existe sur les intermédiaires.

Rockne *et al.* (2000) ont démontré, en utilisant des cultures pures bactériennes, que la croissance anaérobie sur naphtalène (comme source unique de carbone) est possible en conditions réductrices en présence de  $\text{NO}_3$ . Deux espèces ont ainsi été isolées de sédiments marins, une espèce dénitrifiante de *Pseudomonas* (*P. stutzeri*) et une espèce de *Vibrio* (*V. pelagius*) qui réduisent les nitrates en nitrites.

D'autres études ont confirmé que les HAPs peuvent se dégrader en absence d'oxygène si le nitrate est disponible comme accepteur d'électrons (Coates *et al.*, 1996 ; Coates *et al.*, 1997 ; Rockne *et al.*, 2000 ; Zhang et Bennett, 2005). Ainsi, **les conditions de réduction des nitrates paraissent favorables à la dégradation des HAPs.**

### 2) Réduction ferrique

Peu de recherches ont été entreprises sur la dégradation des composés aromatiques en conditions fer-reductrices (Karthikeyan et Bhandari, 2001 ; Ramsay *et al.*, 2003). **Le Fe(III) joue un rôle particulier comme accepteur terminal d'électrons dans les systèmes aquifères et donc dans les transformations biologiques des HAP en condition anoxique.**

### 3) Conditions de sulfato-réduction

**La dégradation des HAPs sous conditions sulfato-réductrices a été étudiée par plusieurs auteurs** (Bedessem *et al.*, 1997; Coates *et al.*, 1996, 1997; Zhang et Young, 1997). La biodégradation significative du naphtalène, du phénanthrène et du fluoranthène dans le cas de sédiments marins contaminés a ainsi été montrée. D'autres études peuvent être citées :

Les études de Chang *et al.* (2001) mettent en évidence le potentiel de dégradation anaérobie du phénanthrène par des bactéries sulfato-réductrices dans des sédiments.

Les premiers résultats sur les métabolites de la dégradation du naphtalène furent publiés en 1997 (Zhang et Young, 1997). Les auteurs ont travaillé sur la biodégradation du naphtalène et du phénanthrène sous conditions sulfato-réductrices. Les intermédiaires identifiés sont : l'acide 2-naphtoïque et l'acide phénantroïque. L'étape initiale de dégradation correspondait à l'incorporation d'un groupe chimique réactif par carboxylation ou par scission d'une molécule d'eau (hydroxylation). La voie réductrice de la biodégradation du naphtalène donne lieu à divers intermédiaires : l'acide 2-naphtoïque, le 1,2,3,4-tetrahydro-acide-2-naphtoïque, le 5,6,7,8-tetrahydro-2-acide naphtoïque, l'hexahydro-2-acide naphtoïque, l'octahydro-2-acide-naphtoïque, et le decahydro-2-acide naphtoïque.

### 4) Conditions de méthanogénèse

Trably (2002) a montré dans sa thèse au moyen de molécules marquées au  $^{14}\text{C}$  que les HAPs étaient réellement dégradés sous conditions anaérobies méthanogènes, sans toutefois montrer la minéralisation totale des HAPs, ni les intermédiaires de la réaction. L'analyse de la population par méthode moléculaire a révélé la présence d'un consortium microbien particulier adapté à la dégradation des HAPs.

## 5. Etude de cas

Des procédés, tels que la désorption à basse température (DBT), peuvent être utilisés pour assainir les sols contaminés par des hydrocarbures lourds. Au bilan, cette option est coûteuse et il faut assurer une intense supervision des travaux.

**Beaucoup de travaux ont porté sur l'atténuation naturelle des HAP. Cependant, dans le cadre des expérimentations en laboratoire, les sols sont souvent pollués artificiellement et les populations microbiennes sont ajoutées à la matrice, ce qui est éloigné du sujet de l'étude basé sur la biodégradation naturelle dans les sols.**

L'utilisation du principe d'atténuation naturelle est de plus en plus répandue aux États-Unis et l'U.S. EPA prévoit un encadrement juridique à l'utilisation de l'atténuation naturelle des composés organiques et inorganiques. À ce sujet, plusieurs méthodologies d'évaluation ont été développées, notamment les protocoles ASTM (1998), U.S. Air Force (Wiedemeier *et al.*, 1995) et les recommandations de l'US EPA. Essentiellement, ces protocoles sont basés sur la prédiction, par l'utilisation de modèles de transport et de transformation, du niveau de déplacement des panaches de contamination dans les eaux souterraines. Ces protocoles considèrent aussi la démonstration d'une activité de biodégradation, par l'analyse détaillée des données physico-chimiques du site ainsi qu'une évaluation du danger écotoxique associé aux points de résurgence.

Les études de terrain rencontrées regroupent des essais de bio traitement aérobie sur sols pollués ou des retours d'observation d'atténuation naturelle après échantillonnage des terres polluées.

### 1) Bactéries

En Iran, la bioremédiation de sols sablonneux (à plus de 90%) contaminés par des HAP (dont le phénanthrène à des teneurs de 10 à 100 mg/kg) a été envisagée sur 3 sites : une raffinerie de pétrole à Téhéran, une zone industrielle à Bahrégan et un réservoir de produits pétroliers à Téhéran. **La présence de populations bactériennes (de l'ordre de  $7.10^5$  UFC) dans les sols étudiés a permis d'envisager de ne pas traiter ces sols par voie chimique** (Arbabi *et al.*, 2004).

L'atténuation naturelle de sols riches en éléments minéraux ou non et, contaminés par des carburants Diesel (2,6 µg /g sol en HAP totaux), a été suivie dans des milieux extrêmes comme les glaciers alpins durant 3 ans (de 1997 à 1999) par Margesin et Schinner (2001). **Ces auteurs ont montré la réduction effective des polluants de 50 à 70% dans le sol non fertile et dans le sol fertile respectivement après 780 jours et, une stimulation des populations bactériennes lors de la première année d'étude.**

Hurst *et al.* (1995) ont étudié les effets de la concentration en oxygène dissous sur une parcelle d'un sol expérimental de l'Université du Montana dont les teneurs en polluants sont de 88 mg/kg HAP (16) et 37 mg/kg Pentachlorophénol. **La biodégradation des HAP est observée même pour des teneurs basses en oxygène** (minéralisation du pyrène d'environ 45 à 55 % après 70 jours pour des teneurs de 2 à 21% d'oxygène).

### 2) Champignons

Concernant les expérimentations relatives aux microorganismes fongiques, **la littérature consultée indique la capacité de champignons à dégrader les HAP** ; certains de ces champignons sont ubiquistes (*P. chrysosporium*) et contribuent à la décomposition de végétaux dans les sols (Brodkorb et Legge, 1992).

D'autres de ces microorganismes fongiques sont spécifiques d'un milieu extrême. Koivula *et al.* (2004) se sont intéressés aux sols acides (pH = 3,6) de forêts de pins (Finlande) dont la particularité est liée à leur richesse en humus. Ces auteurs ont observé une biodégradation du pyrène (> 100 µg/kg/jour) dans des microcosmes (dont la teneur initiale était de 91,2 mg/kg en pyrène) après 180 jours indiquant que l'humus des ces forêts de conifères contient une population microbienne dégradant les HAP.

Richard et Dumas (2002) ont réalisé des **essais en andains avec aération à 250 m<sup>3</sup>/h sur un sol dont les HAP à 2 et 3 cycles étaient présents à 60 % et les plus de 4 cycles à 40 %**. La concentration en HAP avant traitement était de 820 ± 225 mg/kg. Plusieurs cas de figures ont été envisagés : le témoin aéré, avec ajout de compost (10%), avec inoculation du champignon filamenteux *Trametes versicolor* ou avec ajout de cyclodextrine (1 Kg/T). Les meilleurs résultats sont obtenus avec le cyclodextrine et montrent un abattement important de 86 % (de 820 à 114 mg/kg) sur les 120 jours de test. Ces résultats sont à mettre en relation avec une augmentation de la biodisponibilité des HAP grâce aux cyclodextrines.

## **6. Paramètres influençant la biodégradation des HAP**

Généralement, les sites industriels pollués par les HAP sont dits multi-pollués. Par exemple, les sites de traitement du bois (créosote) sont également contaminés par des composés phénoliques. La présence de contaminants type métaux ou cyanures et/ou de fortes concentrations en solution peuvent ralentir, voire inhiber les processus métaboliques des bactéries (ATSDR, 1995 ; Hurst *et al.*, 1996), le degré et le mécanisme de toxicité variant avec les micro-organismes exposés.

Selon le travail de revue effectué au cours de la thèse de Gabet (2004), divers paramètres environnementaux ont été étudiés et les principales remarques sont :

- Le **pH optimal** de dégradation se situe entre **7 et 7,8** et la température optimale est de **20-30°C**, l'humidité du sol doit également être suffisante (**25 à 90 %**).
- Les **nutriments essentiels**, N et P, doivent être sous forme disponibles et être à des concentrations et des rapports appropriés. En effet, en théorie, le rapport molaire optimal entre **C, N et P est de 120/10/1**.

Okolo *et al.* (2005) ont étudié la dégradation dans un sol agricole riche en terreau sableux (Nigeria) ayant reçu un amendement en purin de volaille (seul à 1% m/m ou en mélange avec un surfactant à 0,01% m/v ou avec du glucose). Le **sol amendé** avec le mélange de purin et de glucose **montre une meilleure biodégradation des composés pétroliers** (consommation de 600 ppm après 6 semaines) avec une augmentation des populations bactériennes et fongiques hétérotrophes.

Dans les sols, **le taux de biodégradation est influencé également par le contenu en oxygène, la température et l'humidité** (Hurst *et al.*, 1996). Erickson *et al.* (2000) ont montré l'influence de la structure du sol sur le transport de l'oxygène dans les sols. Cet auteur indique que plus un sol est dense, moins les nutriments et l'O<sub>2</sub> sont transportés vers la flore indigène du milieu, responsable de la biodégradation. De même, Nam *et al.* (2003) ont observé que les agrégats de sols réduisaient la biodégradation.

Concernant la voie anaérobie, McNally *et al.* (1998), Rockne et Strand (1998) et Chang *et al.* (2002) ont montré que certains HAP (naphtalène, fluorène, phénanthrène, anthracène,

fluoranthène et pyrène) étaient dégradés en absence d'oxygène lorsque des nitrates ou des sulfates assuraient le rôle de réducteur. **Le taux de biodégradation est plus lent en conditions anaérobies car les HAP ont tendance à être extrêmement stables** (Rockne et Strand, 1998).

De nombreux auteurs indiquent que **les HAP ne peuvent être biodégradés que lorsqu'ils sont biodisponibles**. Généralement, plus le taux en matières organiques des sols est élevé et moins les HAP sont biodisponibles du fait des fortes interactions hydrophobes entre le polluant et le sol pouvant être rompues seulement par quelques bactéries compétentes (Vacca *et al.*, 2005). Ortega-Calvo et Saiz-Jimenez (1998), ont étudié les effets de fractions humiques et d'argiles sur la biodégradation du phénanthrène dans les sols. Ainsi, la combinaison de 100 µg/ml d'acides humiques + 10 g/l d'argiles permet la minéralisation du phénanthrène (à la concentration de 1 µg/ml) par *P. fluorescens* (25 % de <sup>14</sup>C minéralisé après 100 heures).

Le département Génie Chimique de l'École Polytechnique de Montréal (R. Samson, co-directeur) travaille sur l'augmentation de biodisponibilité des HAP de sols contaminées à la créosote. **L'effet de l'ajout d'acides humiques dissous sur la biodisponibilité des HAP a été montré lors de plusieurs expérimentations**. Ainsi, La modulation de la biodisponibilité des HAP par l'ajout d'acides humiques a montré l'effet de matériel organique sur la performance de dégradation des consortiums microbiens produits par bioactivation (D'amours *et al.*, 2006 ; 2005).

**L'âge de la pollution est également une limite à la biodisponibilité des HAP**, essentiellement en permettant aux polluants d'accéder à des sites d'adsorption du sol peu accessibles aux microorganismes (rapport BRGM, 2003).

Le tableau 17 récapitule les facteurs favorisant la biodégradation des HAP.

Facteurs de biodégradation	Bilan des données recensées
le pH	7-7,8
le contenu en nutriments	C/N/P = 120/10/1
le contenu en oxygène	pour la voie aérobie
la température	20-30°C
le taux d'humidité	20-90 %
la présence d'accepteurs d'électrons	nitrate, fer, sulfate, CH <sub>4</sub> pour la voie anaérobie
la biodisponibilité des HAP	taux MO faibles
l'âge de la pollution	pollution récente (< à 50 ans)

**Tableau 17.** Récapitulatif des paramètres influençant la biodégradation des HAP

## 7. Production et (Eco)toxicité des métabolites

\* La dégradation des HAP dans le sol est dominée par des souches bactériennes appartenant à un nombre limité de groupes taxonomiques tels que *Sphingomonas*, *Pseudomonas* et Mycobactérie (Ho *et al.*, 2000 ; Bastiaens *et al.*, 2000 ; Johnsen *et al.*, 2002). Johnsen *et al.* (2005) ont conclu que l'efficacité de biodégradation d'HAP est caractérisée par son oligotrophie intrinsèque, une tendance normale de former des biofilms et la capacité d'acquérir et d'exprimer des gènes de dégradation.

\* Dans la surveillance des sites et sols pollués, des composés comme le naphthalène, le B(a)A et B(a)P sont des composés à surveiller car classés par l'IARC comme cancérogènes potentiels (tableau 13). Ainsi, les sites contaminés par ces molécules représentent des lieux « à risque » potentiel et dont le devenir doit être bien défini. Le tableau 19 présente les résultats de divers travaux définissant dans la mesure du possible les principaux métabolites issus de l'action des micro-organismes sur les HAP.

\* L'analyse des données montre que des métabolites sont communs pour certains HAP (tableau 18) :

Composé	Métabolites
Naphtalène	Acide 2-naphtanoïque, 1,2-dihydroxy naphtalène, Acide 1-hydroxy-2-naphtanoïque, Acide 2-hydroxy-3-naphtoïque, CO2
Phénanthrène	Acide diphénique, Acide 1-hydroxy-2-naphtanoïque, Acide phatlique, 1,2-dihydroxy naphtalène, naphtalène, acide 2-hydroxy-3-naphtoïque, acide 2-hydroxy-3-phénanthroïque, CO2
Anthracène	Acide 2-hydroxy-3-naphtoïque, Anthrone, Acide phatlique, 9,10-Anthraquinone
Benzo(a)Anthracène	Acide 1-hydroxy-2-anthranoïque, acide 2-hydroxy-3-phénanthroïque, acide 3-hydroxy-2-phénanthroïque

*En couleur sont indiqués les métabolites en commun*

**Tableau 18.** Récapitulatif des métabolites recensés pour quelques HAP

\* Les bactéries ont beaucoup été employées dans les études en laboratoire de la dégradation des HAP comparées aux autres micro-organismes tels que les champignons. Les métabolites sont souvent analysés par chromatographie gazeuse ou liquide dans des expérimentations en batch. La comparaison de la toxicité des composés parents avec les métabolites obtenus montrent que dans la plupart des cas la biodégradation va permettre une détoxification des substrats et ainsi une décontamination *in situ* (tableau 18). Les produits de dégradation des HAP sont le plus souvent des composés en cis s'ils proviennent de la dégradation par les bactéries et des composés en trans s'ils proviennent de la dégradation par les champignons.

**\* Les principaux produits de dégradation sont :**

- **des alcools,**
- **des acides carboxyliques,**
- **des composés dihydrodiols,**
- **des quinones.**

\* Peu de travaux existent sur la biodégradation des HAP à 6 cycles (Benzo(ghi)pérylène, Indéno(123-cd)pyrène). Les données recensées montrent que des composés tels que le Benzo(ghi)perylene sont biodégradés lentement. La  $\frac{1}{2}$  vie de ce composé est de l'ordre de 600 à 650 jours dans un sol aérobie. Néanmoins, Zheng et Obbard (2002) ont montré l'oxydation par le champignon *Phanerochaete chrysosporium* du Benzo(ghi)pérylène dans des sols contaminés par des HAP au cours d'expérimentations en batch. La solubilité du Benzo(ghi)pérylène a été stimulée au moyen d'agent surfactant (Tween 80). Cependant, il n'y a pas de données fournies sur les métabolites obtenus et sur leur toxicité.

Molécule parente	Nb cycle	N°CAS	Toxicité molécule- parente						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites						Localisation	Références
			PNEC aq µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité UE	BCF mesuré ou estimé					PNEC aq µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau tox UE	BCF mesuré ou estimé		
Naphtalène (150 µM) Solubilité eau (20°C): aucune Pression vapeur à 25°C : 11 Pa Log Kow : 3,3	2	91-20-3	12	2B	Cat 3	2600	Faible	427 (poisson)	Consortium bactérien (mixte) isolé de sédiments contaminés	Batch : Biodégradation anaérobie 10% sédiment + 90% milieu minéral + 20 mM de sulfate 150 jours incubation	Acide 2-naphtoïque Solubilité eau (25°C): 47 mg/l Pression vapeur à 20°C : ?? Log Kow : 3,28	93-09-4	ND	Non classé	Non classé	4500	Faible	ND	intracellulaire	Zhang et Young, 1997
	Phénanthrène (200 µM) Solubilité eau 25°C: 1,2 mg/l P° vapeur (20°C): 0,091 Pa Log Kow : 4,57	3	85-01-8	1,34	3	Non classé	750	Nocif			1240 (bivalve)	CO <sub>2</sub> Solubilité eau 25°C: 1480 mg/l P vapeur à 25°C : 6438 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20 calcul	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat	22,5		
Naphtalène (1 mg/l)	2	91-20-3	12	2B	Cat 3	2600	Faible	427 (poisson)	Consortium bactérien dénitrifiant (mixte) 10 <sup>5</sup> org/g sol	Batch : Biodégradation anaérobie Ratio sol/eau = 1/25 et 1/50, 99% dégradation après 9 sem	??	??							Mihelcic et Luthy, 1988	
Phénanthrène (7 mg/l)	3	85-01-8	1,34	3	Non classé	750	Faible	1240 (bivalve)			??	??								
1 % HAP-2 cycles 40 % HAP 3-4 cycles 10 % HAP 5-6 cycles + Zn + Pb + Cu	2 3-4 5-6	Mélanges de HAPs						Consortium bactérien et fongique (mixte) <i>Pseudomonas fluorescens</i> (sol 1) <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Sphingomonas sp.</i> , <i>Pasteurella</i> (sol 2)	Microcosme : Biodégradation aérobie Température = 20°C, pH = 7.7, <4 cycles dégradés 2 sols : sol 1 = 2150.3 mg 16HAP/kg MS ; sol 2 = 1121.5 mg 16HAP/kg MS 35% et 46% dégradation sol 1 et 2 ap 12 mois	??	??								Lors Mossmann, 2005	
Acenaphtene (stock: 20 mg dans 1 ml acetone) Solubilité eau 25°C: 3,7 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,28 Pa Log Kow : 3,92	3	83-32-9	3,7 calcul	Non classé	Non classé	175	Toxique	254 (poisson)	<i>Beijerinckia sp.</i>	Cooxydation aérobie en batch : Incubation à 30°C pendant 24 h et analyse HPLC	1-Acenaphthenol	6306-07-6	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	Schocken et Gibson, 1984
											Cis1,2-Acenaphthenediol	17976-92-0	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	
											1-Acenaphthenone	2235-15-6	ND	Non classé	Non classé	100	Toxique	??	intracellulaire	
											1-Acenaphthene quinone Solubilité eau (25°C): 90 mg/l P vapeur à 25°C : 0,002 Pa Log Kow : 1,95	82-86-0	20 calcul	Non classé	Non classé	728	Nocif	ND	??	
Acenaphtylène (stock: 20 mg dans 1 ml acetone) Solubilité eau (25°C): 16 mg/l P° vapeur à 20°C : 3,99 Pa Log Kow : 4,07	3	208-96-8	??	Non classé	Non classé	1760	Nocif	690 (poisson)	<i>Beijerinckia sp.</i>	Cooxydation aérobie en batch : Incubation à 30°C pendant 24 h et analyse HPLC	Cis-1,2-Acenaphthenediol	17976-92-0	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	Schocken et Gibson, 1984
											Acenaphthene Solubilité eau (25°C): 3,7 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,28 Pa Log Kow : 3,92	83-32-9	3,7 calcul	Non classé	Non classé	175	Toxique	254 (poisson)	extracellulaire	
											1-Acenaphthene quinone Solubilité eau (25°C): 90 mg/l P vapeur à 25°C : 0,002 Pa Log Kow : 1,95	82-86-0	20 calcul	Non classé	Non classé	728	Nocif	ND	??	
Fluorène (1 g/l) Co-substrat = phénanthrène, fluoranthène ou pyrène Solubilité eau (25°C): 1,98 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,04 Pa Log Kow : 4,18	3	86-73-7	0,25 calcul	3	Non classé	125	Toxique	505 (crustacé)	<i>Mycobacterium sp. BB1</i>	Cométabolisme Température = 30°C, pH = 7.0 Après 31 j, [9-fluorenone] = 45 mg/l	9-fluorenone Solubilité eau (25°C): 25 mg/l P vapeur à 25°C : 0,008 Pa Log Kow : 3,58	486-25-9	ND	Non classé	Non classé	2000	Faible	310	intracellulaire	Boldrin et al., 1993
											9-hydroxyfluorene	1689-64-1	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	
											1-indanone Log Kow : 2,11	83-33-0	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	extracellulaire	
Fluorène (550 nmol/ml) Solubilité eau (25°C): 1,98 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,04 Pa Log Kow : 4,18	3	86-73-7	0,25 calcul	3	Non classé	125	Toxique	505 (crustacé)	<i>Arthrobacter sp.</i>	Biodégradation aérobie en batch Température = 22°C, pH = 7 Après 18 jours, 99 % dégradation + métabolite majoritaire = 3-hydroxy-1-indanone (60 nm/ml)	9-fluorenone Solubilité eau (25°C): 25 mg/l P vapeur à 25°C : 0,008 Pa Log Kow : 3,58	486-25-9	ND	Non classé	Non classé	2000	Faible	310	intracellulaire	Casellas et al., 1997
											4-hydroxy-9-fluorenone	1986-00-1	ND	Non classé	Non classé	178	Toxique	ND	intracellulaire	
											3-hydroxy-1-indanone	26976-59-0	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	
											1-indanone Log Kow : 2,11	83-33-0	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	
											3-2-hydroxyphenyl propionate	495-78-3	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	
											Acide salicylique Solubilité eau (20°C): 0,2g/100ml P vapeur à 130°C : 114 Pa Log Kow : 2,2	69-72-7	214 calcul	Non classé	Non classé	891	Nocif	1,49	intracellulaire	

Molécule parente	Nb cycle	N°CAS	Toxicité molécule- parente						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites						Localisation	Références	
			PNEC aq µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité UE	BCF mesuré ou estimé					PNEC aq µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau tox UE	BCF mesuré ou estimé			
Phénanthrène Marquage <sup>14</sup> C Solubilité eau (25°C): 1,2 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,091 Pa Log Kow : 4,57	3	85-01-8	1,34	3	Non classé	750	Nocif	1240 (bivalve)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Oxydation aérobie in vitro	Phénanthrène-9,10-Quinone Solubilité eau (25°C): 7,5 mg/l P vapeur à 25°C : 0,0003 Pa Log Kow : 2,52	84-11-7	ND	Non classé	Non classé	165 Anti-mitotique	Toxique	ND	intracellulaire	Hammel, 1995 Hammel et al., 1992	
											Acide 2,2'diphénique Solubilité eau (25°C): 100 mg/l P vapeur à 25°C : 1,3.10 <sup>-6</sup> Pa Log Kow : 2,07	482-05-3	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	??		
											CO <sub>2</sub> Solubilité eau (20°C): 88ml/100ml P vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat	22,5	extracellulaire			
Phénanthrène (1 g/l) Solubilité eau (25°C): 1,2 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,091 Pa Log Kow : 4,57	3	85-01-8	1,34	3	Non classé	750	Nocif	1240 (bivalve)	<i>Mycobacterium sp. BB1</i>	Biodégradation aérobie en batch Température = 30°C, pH = 7.0 Après 141 h, [phénanthrène] = 90 mg/l Tx croissance = 0.069 h <sup>-1</sup>	Acide 1-hydroxy-2-naphtoiue Log Kow : 3,42	86-48-6	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	??	Boldrin et al., 1993	
											Acide phtalique Solubilité eau (25°C): 7 g/l P vapeur à 20°C : ??kPa Log Kow : 0,79	88-99-3	ND	Non classé	Non classé	1100	Nocif	2	??		
											Protocatechuate Solubilité eau (14°C): 18 g/l P vapeur à 25°C : 3.10 <sup>-4</sup> Pa Log Kow : 0,86	99-50-3	ND	Non classé	Non classé	800	Nocif	ND	intracellulaire		
Phénanthrène  Pyrène Marquage <sup>14</sup> C Solubilité eau (25°C): 0,13 mg/l P° vapeur à 20°C : 0,03 Pa Log Kow : 5,32	3 4	85-01-8 129-00-0	1,34 0,012 calcul	3 3	Non classé Non classé	750 2700	Nocif Faible	1240 (bivalve) 2700 (crustacé)	<i>Aspergillus niger</i> isolé d'un sol contaminé par hydrocarbures	Oxydation aérobie in vitro Température = 24°C 63 jours d'incubation	1-methoxy-phénanthrène (majoritaire)	834-99-1	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	??	Sack et al., 1997	
											1- et 2- phenanthrol	2433-56-9	ND	Non classé	Non classé	ND	Réactif anti oxydant	ND	ND		??
Anthracène (25-28 µM) Solubilité eau (25°C): 1,29 mg/l P° vapeur à 25°C : 0,01 Pa Log Kow : 4,45	3	120-12-7	0,063	3	Non classé	1000	Nocif	900 (poisson)	<i>Bjerkandera sp.</i>	Oxydation aérobie en batch : Température = 23°C, Après 7 h d'incubation, 23 µM dégradé et formation 12 µM anthraquinone	Anthrone Solubilité eau (25°C): 4,6 mg/l P vapeur à 25°C : 0,002 Pa Log Kow : 3,66	90-44-8	ND	Non classé	Non classé	ND	Irritant	ND	360	??	Eibes et al., 2006
											9,10-Anthraquinone Solubilité eau (20°C): faible P° vapeur (20°C): négligeable Log Kow : 0,79	84-65-1	5 calcul	Non classé	Non classé	> 5000 Antimite	Non toxique	12	??		
											Acide phtalique Solubilité eau (25°C): 7 g/l P vapeur à 20°C : ??kPa Log Kow : 3,39	88-99-3	ND	Non classé	Non classé	1100	Nocif	2	??		
Fluoranthène (0.5 mg/ml) Solubilité eau (25°C): 0,26 mg/l P° vapeur à 25°C : 0,001 Pa Log Kow : 5,1	4	206-44-0	3 calcul	3	Non classé	2000	Nocif	1742 (daphnie)	<i>Mycobacterium sp. KR20</i>	Biodégradation aérobie en batch T° = 20°C, après 10 j, 60 % dégradation	Fluoranthène cis-2,3-dihydrodiol	83606-69-3	??	??	??	??	??	??	intracellulaire	Rehmann et al., 2001	
											Acides carboxyliques	??	??	??	??	??	??	??			
Pyrène Solubilité eau (25°C): 0,13 mg/l P° vapeur à 25°C : 0,01 Pa Log Kow : 5,32	4	129-00-0	0,012 calcul	3	Non classé	2700	Faible	2700 (crustacé)	Microflore acclimatée d'un sol contaminé dont <i>Bacillus subtilis</i>	Voie aérobie : Incubation à 27°C pendant 15 mois du sol neutre + microflore du sol contaminé + HAP seul 75% dégradé après 15 mois	??	??	??	??	??	??	??	??	Mahmood et Rao, 1993		
Pyrène (30-35 µM)	4	129-00-0	0,012 calcul	3	Non classé	2700	Faible	2700 (crustacé)	<i>Bjerkandera sp.</i>	Oxydation aérobie en batch : Température = 23°C, Après 24 h, 17 µM dégradé	1-hydroxypyrene	5315-79-7	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	??	Eibes et al., 2006	
Pyrène (180 µg/ml)	4	129-00-0	0,012 calcul	3	Non classé	2700	Faible	2700 (crustacé)	<i>Mycobacterium sp.</i>	Oxydation aérobie en batch : Température = 25°C, Après 8 j, 60% dégradé (72 µg/ml)	Acide Phénanthrène 4,5-dicarboxylique	5462-82-8	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire	Vila et al., 2001	
											Acide Phénanthrène 4-carboxylique	75543-78-1	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire		
											Acide o-phtalique Solubilité eau (25°C): 7 g/l P vapeur à 20°C : ??kPa Log Kow : 3,39	88-99-3	ND	Non classé	Non classé	1100	Nocif	2	intracellulaire		

Molécule parente	Nb cycle	N°CAS	Toxicité molécule- parente						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites					Localisation	Références	
			0,01 calcul	2A	Cat 2	300	Toxique	3180 (algue)					ND	Non classé	Non classé	ND	ND			ND
Benzo(a)anthracène ( <sup>14</sup> C) Solubilité eau 25°C: 0,13 mg/l P° vapeur à 25°C : 0,01 Pa Log Kow : 5,32	4	56-55-3	0,01 calcul	2A	Cat 2	300	Toxique	3180 (algue)	<i>Beijerinckia B1</i>	Oxydation aérobie en batch (induction par biphenyl, m-xylène et salicylate) ; T° = 30°C Ap 14h, 56% dégradation	Acide 1-hydroxy-2-anthranique (majoritaire) Ac 2-hydroxy-3- et 3-hydroxy-2-phenanthroïques	108239-903 ??	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	??	Mahaffey <i>et al.</i> , 1988
Benzo(a)pyrène Marquage <sup>14</sup> C Solubilité eau (25°C): 0,003mg/l P° vapeur (25°C): 0,00007Pa Log Kow : 6	5	50-32-8	0,05	2A	Cat 2	1600	Nocif	2310 (poisson)	<i>Mycobacterium sp.</i>	Oxydation aérobie in vitro 32 jours d'incubation	BaP cis-4,5-dihydrodiol Acide 7,8-dihydropyrène-8-carboxylique	72040-30-3 ??	ND	Non classé	Non classé	ND	ND	ND	intracellulaire ??	Schneider <i>et al.</i> , 1996
Benzo(a)pyrène 20 µg/ml	5	50-32-8	0,05	2A	Cat 2	1600	Nocif	2310 (poisson)	<i>Bacillus subtilis</i> isolée d'un sol contaminé par HAP	Oxydation aérobie in vitro Température = 30°C, Après 4 j, 50 % B(a)P transformé	??	??						??	Hunter <i>et al.</i> , 2005	

■ Molécule classée comme cancérogène par l'IARC

ND Non déterminé; PNEC Previsible Non Effect Concentration ; BCF Facteur de bioaccumulation

Sources : HSDB, INERIS, Inchem, Google

**Tableau 19.** (Eco)toxicité des HAPs (issus de la liste US-EPA) et de leurs produits de biodégradation

## **8. A retenir**

L'étude de la biodégradation des HAP dans les sols contaminés se différencie selon la taille des molécules car les communautés de micro-organismes dégradent différemment les HAP de faible poids moléculaire (2-3 noyaux) de ceux à fort poids moléculaire (5-6 cycles).

### **Dégradation aérobie :**

Les bactéries oxydent initialement les hydrocarbures aromatiques polycycliques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration cis. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. L'oxydation des cis-dihydrodiols conduit à la formation de catéchols. Généralement, l'oxydation se poursuit par une rupture ortho (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) ou méta du cycle qui est assuré par une autre dioxygénase.

Cas des HAP de 2-3 cycles : Diverses espèces de *Pseudomonas* oxydent le naphthalène pour aboutir dans un premier temps à un radical cis-dihydrodiol. Le radical cis-dihydrodiol va donner le 1,2-dihydroxynaphthalène qui sera métabolisé en dérivé salicylé.

Cas des HAP de plus de 4 cycles : Divers auteurs ont démontré que leurs voies métaboliques ressemblent à celles du naphthalène avec incorporation initiale d'une molécule de dioxygène par une dioxygénase suivie d'une dégradation en chaîne des cycles benzéniques.

### **Dégradation anaérobie :**

Deux étapes initiales ont été proposées dans le mécanisme de dégradation anaérobie : la carboxylation et l'hydroxylation. Dans ce cas, le potentiel redox devient un facteur critique dans la détermination de la diversité métabolique des populations microbiennes dans les sols, sédiments et systèmes aquifères. Néanmoins, les HAP lourds tels que le Pyrène, le Benzo(a)Anthracène et le Benzo(a)Pyrène semblent difficilement dégradables en conditions anaérobies. Le manque de travaux ne permet pas de conclure sur ce point.

### **Etudes de terrain :**

Les études de terrain rencontrées dans la littérature regroupe des essais de bio traitement aérobie sur sols pollués ou des retours d'observation d'atténuation naturelle après échantillonnage des terres polluées. Divers paramètres spécifiques des sols analysés influencent la biodégradation des HAP : pH, nutriments, O<sub>2</sub>, T°, % humidité, biodisponibilité des HAP, ancienneté de la contamination.

### **Propriétés des métabolites :**

Les HAP, jusqu'à 5 cycles, sont intrinsèquement dégradables, et peuvent directement être utilisés comme substrat organique par certaines espèces de micro-organismes en milieu aérobie (essentiellement) ou anaérobie. La destruction des HAP par des micro-organismes conduit à la formation de produits de dégradation. Ces métabolites néoformés sont généralement plus solubles, et par conséquent plus mobiles, et présentent une toxicité différente de celle des HAP initiaux souvent plus faible (*dans le cas des quinones*, nous sommes intéressés qu'aux exemples relevés, cette remarque n'est donc pas à généraliser à l'ensemble des quinones). Ces métabolites peuvent eux-même se dégrader et se minéraliser. Ils peuvent également s'accumuler dans les sols si leur cinétique de dégradation est plus lente que leur cinétique d'apparition.

*Le dioxyde de carbone et quelques quinones sont excrétés par les micro-organismes lors du processus de dégradation. Le CO<sub>2</sub> gazeux se dissémine dans l'air et les quinones dont certaines interviennent comme facteurs de croissance des végétaux, peuvent interagir au niveau racinaire et être absorbées par certaines plantes. Néanmoins, beaucoup des métabolites identifiés sont intracellulaires ou bien aucune indication n'est précisée, ce qui limite les remarques concernant les interactions possibles sol-métabolites.*

**Une problématique de sols pollués représente toujours un cas unique. Il est donc important qu'une caractérisation précise (physique, chimique et microbiologique) des sols soit réalisée en amont de toute décision allant au-delà d'une simple mesure de polluants.**

## **9. Références bibliographiques sur la biodégradation des HAP**

**NB les références indiquées sont celles citées dans le document et ne représente qu'une partie de la bibliographie réunie pour l'étude**

31- D'Amours, Dominic, Samson, Réjean, Deschênes, Louise. 2006. « Production d'un consortium microbien par bioactivation en présence d'acides humiques augmentant la biodisponibilité et la performance de dégradation des HAP de la créosote ». 10e Colloque annuel du Chapitre Saint-Laurent, Québec. 1 et 2 juin 2006.

32- Bernal-Martinez, A. 2005. Elimination des hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans les boues d'épuration par couplage ozonation-digestion anaérobie. Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc.

Nous avons étudié l'élimination des HAPs présents dans les boues d'épuration par couplage de la digestion anaérobie et de l'ozonation. L'ozonation (dose de 0,12 gO<sub>3</sub> / gMS) des boues digérées permet de réduire de 30% environ les HAPs. La réactivité des HAPs avec l'ozone est essentiellement influencée par leur solubilité et le nombre de cycles à 5 atomes de carbone. L'ajout de peroxyde d'hydrogène ou de surfactants a augmenté jusqu'à 65% l'élimination des HAPs. Les surfactants ont amélioré le transfert gaz/liquide de l'ozone et le transfert solide/liquide des HAPs. Nous avons mis en oeuvre différentes configurations (série et recirculation) pour la combinaison de l'ozonation avec la digestion anaérobie continue avec un temps de séjour des boues élevé. Les procédés comprenant une étape d'ozonation conduisent à des taux d'élimination des HAPs par digestion anaérobie supérieurs à ceux de la matière sèche alors que pour les procédés avec digestion anaérobie simple ou deux digestions en série, ces taux d'élimination sont égaux. L'ozonation des boues digérées avec ou sans tyloxapol rend les HAPs plus biodégradables ou biodisponibles à la digestion anaérobie. Les meilleurs taux d'élimination des HAPs ont été obtenus avec les configurations en série et en particulier en présence de tyloxapol. Les procédés avec recirculation ont probablement conduit à la formation de composés réfractaires.

33- D'Amours, Dominic, Samson, Réjean, Deschênes, Louise. 2005. « Enhanced Microbial Consortium Production in a Slurry Bioreactor For Creosote-Contaminated Soil Bioaugmentation Using Humic Acids ». 21st Annual International Conference on Soils, Sediments and Water, University of Massachusetts at Amherst. 17-20 Octobre 2005.

34- Johnsen, A.R., Wick, L.Y. & Harms, H. 2005: Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* 133, 71-84.

35- Okolo, J. C. , Amadi, E. N. , Odu, C. T. I, 2005, Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil, *Applied Ecology and Environmental Research*, 3, 47-53.

The impacts of crude oil pollution on a sandy loam soil and the influence of incorporation of poultry manure alone and in combination with alternate carbon substrates (glucose or starch) and surfactants (Goldcrew or Corexit) were investigated. Oil pollution increased soil organic carbon and reduced soil nitrates and phosphorus, thus imposing a condition that impaired oil degradation in the soil. Treatment of the soil with poultry manure alone, enhanced oil degradation but the extent of this was influenced by the incorporation of alternate carbon substrates or surfactants. Addition of glucose or Corexit encouraged crude oil degradation, while addition of starch or Goldcrew reduced the extent of degradation obtained. The soil amendments interacted in affecting crude oil degradation. This was optimal with a combination of poultry manure (2.0%w/w) + glucose (2.0%w/w) which yielded a crude oil degradation of 7.42±1.02% after sixteen weeks incubation.

36- Rollin C et Quiot F, 2005, HAP, Guide méthodologique : Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques de transferts dans les sols et les eaux souterraines, rapport INERIS, 85 pages.

37- Vacca DJ, Bleam WF, Hickey WJ. 2005, Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Appl Environ Microbiol*. 71(7):3797-805.

The goal of these studies was to determine how sorption by humic acids affected the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) to PAH-degrading microbes. Micellar solutions of humic acid were used as sorbents, and phenanthrene was used as a model PAH. Enrichments from PAH-contaminated soils established with nonsorbed phenanthrene yielded a total of 25 different isolates representing a diversity of bacterial phylotypes. In contrast, only three strains of *Burkholderia spp.* and one strain each of *Delftia sp.* and *Sphingomonas sp.* were isolated from enrichments with humic acid-sorbed phenanthrene (HASP). Using [<sup>14</sup>C]phenanthrene as a radiotracer, we verified that only HASP isolates were capable of mineralizing HASP, a phenotype hence termed "competence." Competence was an all-or-nothing phenotype: noncompetent strains showed no detectable phenanthrene mineralization in HASP cultures, but levels of phenanthrene mineralization effected by competent strains in HASP and NSP cultures were not significantly different. Levels and rates of phenanthrene mineralization exceeded those predicted to be supported solely by the metabolism of phenanthrene in the aqueous phase of HASP cultures. Thus, competent strains were able to directly access phenanthrene sorbed by the humic acids and did not rely on desorption for substrate uptake. To the best of our knowledge, this is the first report of (i) a selective interaction between aerobic bacteria and humic acid molecules and (ii) differential bioavailability to bacteria of PAHs sorbed to a natural biogeopolymer.

38- Zhang C, Bennett GN (2005), Biodegradation of Xenobiotics by Anaerobic Bacteria, Applied Microbiology and Biotechnology, 67:600-618.

Xenobiotic biodegradation under anaerobic conditions such as in groundwater, sediment, landfill, sludge digesters and bioreactors has gained increasing attention over the last two decades. This review gives a broad overview of our current understanding of and recent advances in anaerobic biodegradation of five selected groups of xenobiotic compounds (petroleum hydrocarbons and fuel additives, nitroaromatic compounds and explosives, chlorinated aliphatic and aromatic compounds, pesticides, and surfactants). Significant advances have been made toward the isolation of bacterial cultures, elucidation of biochemical mechanisms, and laboratory and field scale applications for xenobiotic removal. For certain highly chlorinated hydrocarbons (e.g., tetrachlorethylene), anaerobic processes cannot be easily substituted with current aerobic processes. For petroleum hydrocarbons, although aerobic processes are generally used, anaerobic biodegradation is significant under certain circumstances (e.g., O<sub>2</sub>-depleted aquifers, oil spilled in marshes). For persistent compounds including polychlorinated biphenyls, dioxins, and DDT, anaerobic processes are slow for remedial application, but can be a significant long-term avenue for natural attenuation. In some cases, a sequential anaerobic-aerobic strategy is needed for total destruction of xenobiotic compounds. Several points for future research are also presented in this review.

39- M Arbabi, S Nasser, A R Mesdaghinia, S Rezaie, K Naddafi, G H Omrani and M Yunesian, 2004, Survey on Physical, Chemical and Microbiological Characteristics of PAH-Contaminated Soils in Iran, Iranian J Env Health Sci Eng, 1, 26-33.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the important groups of organic micro pollutants (Xenobiotics) due to their widespread distribution and low degradability in the environment (atmosphere, water and soil). Some PAHs exhibit carcinogenic and/or mutagenic properties and are listed by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) and European Commission (EC) as priority pollutants. In this research three petroleum contaminated sites in Iran were selected in order to separate and classify PAH degrading microorganisms. Samples were analysed for: soil physico-chemical properties, soil particle size distribution, Ultrasonic extraction of PAH (phenanthrene) and microbial analysis. Ultrasonic extraction method was shown to be a reliable procedure to extract a wide range of PAH concentrations from different soils, e.g. clay, silt, and clay-silt mixtures. Results showed that the extraction rate of phenanthrene in mentioned different soils was in the range of 85 – 100 percent. Results showed that two of three selected sites were contaminated with phenanthrene in the range of 10 – 100 mg/kg of soil, and had a reasonable population of PAH-degrading bacteria, which were able to adaptate and degradate a concentration range of phenanthrene between 10 and 1000 mg/kg of soil. According to results, it can conclude that, the bioremediation of contaminated soils in Iran may be considered as a feasible practice.

40- Gabet Sophie, Remobilisation d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique, Thèse de doctorat, 9 juillet 2004, Université de Limoges.

41- Koivula, T., Salkinoja-Salonen, M., Peltola, R., Romantschuk, M. 2004. Pyrene degradation in forest humus microcosms with or without pine and its mycorrhizal fungi. *J. Environ. Quality* 33: 45-53.

42- Chang, B.V; Chang, S.W. and Yuan, S.Y. (2003). Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sludge. *Adv. Environ Res.* 7:623-628.

43- Dictor M.C. Berne N. Mathieu O. Moussay A. Saada A. 2003. Influence of Ageing of Polluted Soils on Bioavailability of Phenanthrene. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, Volume 58, p. 481 – 488.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are aromatic compounds persistent in the environment because of their hydrophobic nature, low water solubility and high adsorption onto soils and sediments. Bacteria can degrade phenanthrene dissolved in water but not when adsorbed onto soil particles. The bioavailability of phenanthrene for bacteria used for pollutant degradation was evaluated as a function of ageing of a soil polluted by phenanthrene. Ageing and biodegradation were studied in batches containing a sterile contaminated soil (soil H) and kaolinite coated with heavy fuel oil (KF2), both spiked with <sup>14</sup>C-labelled phenanthrene. The solid matrix was kept in contact with the pollutant for 2, 48 h, 1 week, and 1, 2 and 4 months for soil H, and 2, 48 h and 2 months for KF2. After each contact time, a bacterial culture able to degrade phenanthrene and the nutrient medium was added. For 25 days, <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> produced and <sup>14</sup>C-residual activity in the liquid phase were monitored using liquid scintillation. The metabolites formed during biodegradation were determined by HPLC/UV. Adsorption of phenanthrene on soil H or KF2 was shown by comparing assay without ageing and those with different ageing times. For Soil H, 8%, 40% and 55% of the phenanthrene had been adsorbed after 2, 48 h and 4 months of ageing, respectively. After the addition of degrading bacteria, 25% of phenanthrene had been mineralized in non-aged soil H and only 8% after a 4-month ageing time. This indicates that the amount of substrate available is a limiting factor for bacterial activity. For KF2, phenanthrene adsorption onto the solid was more rapid than that observed with the soil H since 55% of the pollutant had been adsorbed after only 2 h of ageing. This is due to the different nature of the organic matter in KF2 (only one type of organic matter and numerous available adsorption sites) and in the soil H (heterogeneous organic matter and adsorption sites). For both soil H and KF2, 60% of phenanthrene had been adsorbed after 2 months of ageing. With KF2, the percentage of phenanthrene mineralized reached 20% after 2 and 48 h of ageing and decreased to 6% after 2 months of ageing. These experiments show that the availability of the pollutant for bacteria decreased with soil ageing.

44- Doornaert B. et Pichard A. (2003) - HAP - Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérigènes : approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approche par mélanges. Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérigènes : Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR). Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. Verneuil en Halatte. 64 pp. *disponible en ligne*

45- Nam K, Kim JY, 2003, Effect of soil aggregation on the biodegradation of phenanthrene aged in soil.

*Environ Pollut.* 121(1):147-51.

46- Nowak C, Mossmann JR, Saada A, 2003, Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en oeuvre, rapport BRGM.

47- Ramsay, J.A., Hao, L., Brown, R.S., Ramsay, B.A., 2003. Naphthalene and anthracene mineralization linked to oxygen, nitrate, Fe(II) and sulphate reduction in a mixed microbial population. *Biodegradation* 14, 321–329.

48- Tiehm A., Schulze S., 2003, Biodégradation intrinsèque des hydrocarbures aromatiques pour la réhabilitation de nappes aquifères Vol. 58, n°04, p. 449-462.

La biodégradation intrinsèque, qui représente le processus clé de l'atténuation naturelle, est de plus en plus couramment envisagée comme une alternative aux procédés plus actifs pour la réhabilitation de sites contaminés. Dans cet article, la biodégradation intrinsèque des BTEX et des HAP est discutée. La première partie passe en revue la compréhension actuelle de la dégradation microbienne des hydrocarbures aromatiques ainsi que les méthodes disponibles pour l'évaluation de la bioréhabilitation

intrinsèque. Le concept et les résultats obtenus lors d'une étude de cas sont présentés dans une seconde partie. La biodégradation anaérobie et la biodégradation aérobie contribuent toutes deux à l'élimination des polluants de sites contaminés, comme les anciennes usines à gaz ou les décharges polluées par des huiles de pyrolyse. Les processus de biodégradation intrinsèque engendrent habituellement une suite de zones de redox (méthanogène, sulfatoréductrice, Fe(III)-réductrice, dénitrifiante, aérobie) dans le panache des polluants dans l'aquifère en aval de la source de contamination. Les méthodes d'évaluation dans ces différentes zones de redox comprennent l'analyse hydro- et géochimique, la mesure des potentiels redox et la détermination de l'hydrogène. La biodégradation des polluants visés peut être démontrée par la modification des profils de polluant, par le fractionnement isotopique, par des produits spécifiques du métabolisme et par des études en microcosmes sur des échantillons du terrain. Les études en microcosmes constituent un outil particulièrement utile pour identifier les mécanismes de dégradation et pour étudier le rôle d'accepteurs d'électrons spécifiques et des conditions redox.

49- Chang BV, Shiung LC, Yuan SY. 2002, Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*. 48(7):717-24.

Known concentrations of phenanthrene, pyrene, anthracene, fluorene and acenaphthene were added to soil samples to investigate the anaerobic degradation potential of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH). Consortia-treated river sediments taken from known sites of long-term pollution were added as inoculum. Mixtures of soil, consortia, and PAH (individually or combined) were amended with nutrients and batch incubated. High-to-low degradation rates for both soil types were phenanthrene > pyrene > anthracene > fluorene > acenaphthene. Degradation rates were faster in Taida soil than in Guishan soil. Faster individual PAH degradation rates were also observed in cultures containing a mixture of PAH substrates compared to the presence of a single substrate. Optimal incubation conditions were noted as pH 8.0 and 30 degrees C. Degradation was enhanced for PAH by the addition of acetate, lactate, or pyruvate. The addition of municipal sewage or oil refinery sludge to the soil samples stimulated PAH degradation. Biodegradation was also measured under three anaerobic conditions; results show the high-to-low order of biodegradation rates to be sulfate-reducing conditions > methanogenic conditions > nitrate-reducing conditions. The results show that sulfate-reducing bacteria, methanogen, and eubacteria are involved in the PAH degradation; sulfate-reducing bacteria constitute a major component of the PAH-adapted consortia.

50- Johnsen Anders R., Bendixen Karen, and Karlson Ulrich, 2002, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 6, p. 2683-2689.

We have developed a microtiter plate method for screening a large number of bacterial isolates for the ability to grow on different crystalline polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Growth on PAHs cannot easily be determined with standard growth assays because of the very low aqueous solubility and bioavailability of the PAHs. Our microtiter plate assay utilizes a new water-soluble respiration indicator, WST-1 {4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate}, in combination with easily degradable carbon sources. PAH-mineralizing strains were grown on PAHs in microtiter plates for 7 to 10 days. The tetrazolium dye WST-1 was added after incubation. Dehydrogenases in growing cells reduced WST-1 to a water-soluble colored formazan, and the intensity of the color was a measure of the respiration rate. Addition of easily degradable carbon to the wells along with WST-1 resulted in a 3- to 40-fold increase in the absorbance of positive wells within 90 min, which made it possible to detect growth on fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, and pyrene. Addition of the electron transport blocker sodium azide unexpectedly decreased formazan formation. The method was adapted for most-probable-number enumeration of PAH degraders in soil.

51- Kubo T, Urano K, Utsumi H. 2002. Mutagenicity characteristics of 255 environmental chemicals. *J Health Sci* 48(6):545-554.

52- Richard J-Y., K. Dumas, 2002, *Traitement biologique des sols pollués par des hydrocarbures aromatiques polycycliques*, CD-ROM de la 1ère rencontre nationale de recherche sur les sites et sols pollués.

53- Trably, E. (2002). *Etude et optimisation de la biodegradation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et de Polychlorobiphényles (PCBs) au cours de la digestion anaérobie et aérobie*

de boues urbaines contaminées. Thèse de Doctorat de l'Université de Montpellier II. Génie des procédés.

54- Zheng Zhongming and Obbard Jeffrey Philip, 2002, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Removal from Soil by Surfactant Solubilization and Phanerochaete chrysosporium Oxidation, J Environ Qual 31: 1842-1847.

55- Chang, B.V; Chang, J.S. and Yuan, S.Y. (2001). Anaerobic degradation of phenanthrene in river sediment under nitrate-reducing conditions. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 67:898-905.

56- Karthikeyan R, Bhandari A. 2001. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. J Hazard Subst Res 3: 1-19.

57- Margesin R., Schinner F. 2001: Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3127-3133.

We investigated the feasibility of bioremediation as a treatment option for a chronically diesel-oil-polluted soil in an alpine glacier area at an altitude of 2,875 m above sea level. To examine the efficiencies of natural attenuation and biostimulation, we used field-incubated lysimeters (mesocosms) with unfertilized and fertilized (N-P-K) soil. For three summer seasons (July 1997 to September 1999), we monitored changes in hydrocarbon concentrations in soil and soil leachate and the accompanying changes in soil microbial counts and activity. A significant reduction in the diesel oil level could be achieved. At the end of the third summer season (after 780 days), the initial level of contamination ( $2,612 \pm 70 \mu\text{g}$  of hydrocarbons g [dry weight] of soil 1) was reduced by ( $50 \pm 4\%$ ) and ( $70 \pm 2\%$ ) in the unfertilized and fertilized soil, respectively. Nonetheless, the residual levels of contamination ( $1,296 \pm 110$  and  $774 \pm 52 \mu\text{g}$  of hydrocarbons g [dry weight] of soil 1 in the unfertilized and fertilized soil, respectively) were still high. Most of the hydrocarbon loss occurred during the first summer season ( $[42 \pm 6\%]$  loss) in the fertilized soil and during the second summer season ( $[41 \pm 4\%]$  loss) in the unfertilized soil. In the fertilized soil, all biological parameters (microbial numbers, soil respiration, catalase and lipase activities) were significantly enhanced and correlated significantly with each other, as well as with the residual hydrocarbon concentration, pointing to the importance of biodegradation. The effect of biostimulation of the indigenous soil microorganisms declined with time. The microbial activities in the unfertilized soil fluctuated around background levels during the whole study.

58- Sverdrup L.E., Kelley A.E., Krogh P.H., Nielsen T., Jensen J., Scott-Fordsmand J.J. and Stenersen J. (2001) - Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of the springtail *Folsomia fimetaria*. Environ Toxicol Chem, 20, 6, 1332-1338.

59- Bastiaens Leen, Springael Dirk, Wattiau Pierre, Harms Hauke, deWachter Rupert, Verachtert Hubert, and Diels Ludo, 2000, Isolation of Adherent Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)-Degrading Bacteria Using PAH-Sorbing Carriers, Appl. Environ. Microbiol. 66: 1834-1843.

60- Fritsche, W. et M. Hofrichter. 2000. Aerobic degradation by microorganisms. Bio/Technology 11b:145-167.

61- Juhasz AL, Naidu R., 2000, Enrichment and isolation of non-specific aromatic degraders from unique uncontaminated (plant and faecal material) sources and contaminated soils. J Appl Microbiol. 89(4):642-50.

Microbial analysis of contaminated soil and uncontaminated plant and faecal material resulted in the enrichment of a number of microbial communities capable of utilizing a range of environmental pollutants. Growth was observed on polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, heterocyclic aromatic compounds and organochlorine pesticides. However, none of the communities could grow on pentachlorophenol. Pure cultures were isolated from microbial communities using phenanthrene and pyrene as the sole carbon and energy source. Isolates were also obtained using DDT, DOH, DBH and PCPA when peptone was supplemented to the medium. Strain AJR39, 504, isolated using DDT and peptone, could not be positively identified on the basis of substrate utilization tests. However, it most closely resembled *Stenotrophomonas maltophilia* (0.424 similarity) using the Microlog 3 database software. Isolate AJR39, 504 could also grow on polycyclic aromatic

hydrocarbons, chlorinated- and nitro-aromatic compounds. In addition, the degradation of DDT (100 mg l(-1)) by isolate AJR39,504 resulted in a 35% decrease in DDT concentration after 28 days with a concomitant increase in DDD concentration.

62- Kanaly Robert A et Harayama Shigeaki, 2000, Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria, *Journal of Bacteriology*, Vol. 182, No. 8, 2059-2067.

63- Meckenstock, R.U., E. Annweiler, W. Michaelis, H.H. Richnow, and B. Schink. 2000. Anaerobic Naphthalene Degradation by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2743-2747.

64- Rockne, K. J., J. C. Chee-Sanford, R. A. Sanford, B. P. Hedlund, J. T. Staley, and S. E. Strand., 2000, Anaerobic Naphthalene Degradation by Microbial Pure Cultures under Nitrate-Reducing Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 4, 1595-1601.

65- Schützendübel, A.; Majcherczyk, A.; Johannes, C. And Hüttermann A., 1999, Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. *International Biodeterioration Biodegradation*, vol. 43, no. 3, p. 93-100.

66- Semple, K.T., Cain, R.B., and Schmidt, S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 170, 291-300.

67- U. Kirso and N. Irha, 1998, Role of Algae in Fate of Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment, *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 41, 83-89.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) represent an ecotoxicologically relevant, combustion-related substance group. The bioconcentration and transformation of a priority PAH, benzo[a]pyrene (BaP), by brown (*Fucus vesiculosus* and *Chorda filum*), red (*Furcellaria lumbricalis*), green (*Enteromorpha intestinalis* and *Cladophora glomerata*), and chara (*Chara aspera*) algae have been studied. A flux budget was made of the amounts of BaP that are accumulated and metabolized by different algae during an estimated time. The results indicated that of all the BaP consumed, 89–99% was found in the biomass of *Fucus*, an insignificant part was in the solution, and the remainder (up to 4%) was not recovered, i.e., was considered to have been metabolized. For green and chara algae the proportion of transformed PAHs was more essential, 42–49%. The transformation of BaP in marine and freshwater algae is species specific and depends on the presence and activity of enzymes localized in the plant cells. The most important enzyme systems for detoxification of BaP are o-diphenol oxidase, cytochrome P450, and peroxidase. The data obtained indicate the important role of marine and freshwater algae in the fate of carcinogenic PAHs in the environment.

68- Kotterman, M.J.J., E.H. Vis, and J.A. Field. 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo(a)pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2853–2858.

White rot fungi can oxidize high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) rapidly to polar metabolites, but only limited mineralization takes place. The objectives of this study were to determine if the polar metabolites can be readily mineralized by indigenous microflora from several inoculum sources, such as activated sludge, forest soils, and PAH-adapted sediment sludge, and to determine if such metabolites have decreased mutagenicity compared to the mutagenicity of the parent PAH. <sup>14</sup>C-radiolabeled benzo[a]pyrene was subjected to oxidation by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. After 15 days, up to 8.5% of the [<sup>14</sup>C]benzo[a]pyrene was recovered as <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> in fungal cultures, up to 73% was recovered as water-soluble metabolites, and only 4% remained soluble in dibutyl ether. Thin-layer chromatography analysis revealed that many polar fluorescent metabolites accumulated. Addition of indigenous microflora to fungal cultures with oxidized benzo[a]pyrene on day 15 resulted in an initially rapid increase in the level of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> recovery to a maximal value of 34% by the end of the experiments (>150 days), and the level of water-soluble label decreased to 16% of the initial level. In fungal cultures not inoculated with microflora, the level of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> recovery increased to 13.5%, while the level of recovery of water-soluble metabolites remained as high as 61%. No large differences in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production were observed with several inocula, showing that some polar metabolites of fungal benzo[a]pyrene

oxidation were readily degraded by indigenous microorganisms, while other metabolites were not. Of the inocula tested, only PAH-adapted sediment sludge was capable of directly mineralizing intact benzo[a]pyrene, albeit at a lower rate and to a lesser extent than the mineralization observed after combined treatment with white rot fungi and indigenous microflora. Fungal oxidation of benzo[a]pyrene resulted in rapid and almost complete elimination of its high mutagenic potential, as observed in the *Salmonella typhimurium* revertant test performed with strains TA100 and TA98. Moreover, no direct mutagenic metabolite could be detected during fungal oxidation. The remaining weak mutagenic activity of fungal cultures containing benzo[a]pyrene metabolites towards strain TA98 was further decreased by subsequent incubations with indigenous microflora.

69- McNally, D.L., J.R. Mihelcic, and D.R. Lueking. 1998. Biodegradation of Three- and Four-Ring Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Under Aerobic and Denitrifying Conditions. *Environmental Science and Technology*, 32: 2633-2639.

70- Ortega-Calvo, J.J., and C. Saiz Jimenez (1998) Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64:3123-3126.

71- Rama-Mercier, R; Mougin, C; Sigoillot, J.C; Sohier, L; Chaplain, V. and Asther M. (1998). Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol. Tech.* 12(10):725-728.

72- Romero, M.C., Cazau, M.C., Giorgieri, S., Arambarri, A.M., 1998. Phenanthrene degradation by micro-organisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution* 101, 355±359.

73- Bedessem, M.E., N.G. Swoboda-Colberg, and P. J. S. Colberg. 1997. Naphthalene Mineralization Coupled to Sulfate Reduction in Aquifer-Derived Enrichments. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2): 213-218.

74- Coates, J.D., J. Woodward, J. Allen, P. Philip, and D.R. Lovley. 1997. Anaerobic Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Alkanes in Petroleum-Contaminated Marine Harbor Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9): 3589-3593.

75- Harayama S (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 268-73.

76- Zhang, X., and L.Y. Young. 1997. Carboxylation as an Initial Reaction in the Anaerobic Metabolism of Naphthalene and Phenanthrene by Sulfidogenic Consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12): 4759-4764.

77- Coates, J.D., R.T. Anderson, and D.R. Lovley. 1996. Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Under Sulfate-Reducing Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1099-1101.

78- C.J. Hurst, R.C. Sims, J.L. Sims, D.L. Sorensen, J.E. McLean, and S. G. Huling, 1996, Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Biodegradation as a Function of Oxygen Tension in Contaminated Soil. *Journal of Hazardous Materials*, 51: 193-208.

79- Feix, I. et Wiart, J. 1995, Les micropolluants organiques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. ADEME.

80- Hammel KE, 1995, Mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by ligninolytic fungi, *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 5:41-3.

Ligninolytic fungi accomplish the partial degradation of numerous aromatic organopollutants. Their ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is particularly interesting because eukaryotes were previously considered to be unable to cleave fused-ring aromatics. Recent results indicate that extracellular peroxidases of these fungi are responsible for the initial oxidation of PAHs. Fungal lignin peroxidases oxidize certain PAHs directly, whereas fungal manganese peroxidases co-oxidize them indirectly during enzyme-mediated lipid peroxidation.

81- C.J. Hurst, R.C. Sims, J.L. Sims, D.L. Sorensen, J.E. McLean and S. Huling, 1995, Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation as a function of oxygen tension in contaminated soil, Proceedings of the 10th Annual Conference on Hazardous Waste Research.

82- Simonich SL, Hites RA, 1995, Organic pollutant accumulation in vegetation, Environmental Science & Technology 29 (12): 2905-2914.

83- Sutherland, J.B., Rafti, F., Khan, A.A. and Cerniglia, C.E., 1995, Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In: Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals (Eds) Young, L.Y. and Cerniglia, C.E. Wiley Liss, New York. pp 269-306.

84- Wiedemeier, T., Wilston, J.T., Kampbell, D.H., Miller, R.N., and Hansen, J.E. 1995. "Technical Protocol for Implementing Intrinsic Remediation with Long-Term Monitoring for Natural Attenuation of Fuel Contamination Dissolved in Groundwater.", Air Force Center for Environmental Excellence, Technology Transfer Division, Brooks AFB, San Antonio, TX.

85- LCPE, 1994 – Loi Canadienne sur la protection de l'environnement : Hydrocarbures aromatiques polycycliques, Liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation. *disponible en ligne*

86- Boldrin B, Tiehm A and Fritzsche C, 1993, Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. Appl Environ Microbiol. 59(6): 1927–1930.

*Mycobacterium* sp. strain BB1 was isolated from a former coal gasification site. It was able to utilize phenanthrene, pyrene, and fluoranthene as sole sources of carbon and energy and to degrade fluorene cometabolically. Exponential growth with solid phenanthrene, pyrene, and fluoranthene was obtained in fermentor cultures. The growth rates were 0.069, 0.056, and 0.040 h<sup>-1</sup>, respectively. Several metabolites of phenanthrene and fluorene metabolism were identified.

87- Kelley I, Freeman JP, Evans FE, Cerniglia CE. 1993, Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. Appl Environ Microbiol. 59(3):800–806.

*Mycobacterium* sp. strain PYR-1, previously shown to extensively mineralize high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in pure culture and in sediments, degrades fluoranthene to 9-fluorenone-1-carboxylic acid. In this study, 10 other fluoranthene metabolites were isolated from ethyl acetate extracts of the culture medium by thin-layer and high-performance liquid chromatographic methods. On the basis of comparisons with authentic compounds by UV spectrophotometry and thin-layer chromatography as well as gas chromatography-mass spectral and proton nuclear magnetic resonance spectral analyses, the metabolites were identified as 8-hydroxy-7-methoxyfluoranthene, 9-hydroxyfluorene, 9-fluorenone, 1-acenaphthenone, 9-hydroxy-1-fluorene-carboxylic acid, phthalic acid, 2-carboxybenzaldehyde, benzoic acid, phenylacetic acid, and adipic acid. Authentic 9-hydroxyfluorene and 9-fluorenone were metabolized by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. A pathway for the catabolism of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1 is proposed.

88- F M Menn, B M Applegate, and G S Sayler, 1993, NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1938-1942.

*Pseudomonas fluorescens* 5R contains an NAH7-like plasmid (pKA1), and *P. fluorescens* 5R mutant 5RL contains a bioluminescent reporter plasmid (pUTK21) which was constructed by transposon mutagenesis. Polymerase chain reaction mapping confirmed the localization of lux transposon Tn4431 300 bp downstream from the start of the nahG gene. Two degradation products, 2-hydroxy-3-naphthoic acid and 1-hydroxy-2-naphthoic acid, were recovered and identified from *P. fluorescens* 5RL as biochemical metabolites from the biotransformation of anthracene and phenanthrene, respectively. This is the first report which provides direct biochemical evidence that the naphthalene plasmid degradative enzyme system is involved in the degradation of higher-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons other than naphthalene.

89- Wild, S.R., and K.C. Jones. 1993. Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. Environ. Toxicol. Chem. 12:5–12.

90- T S Brodkorb and R L Legge, 1992, Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol.* 58(9): 3117-3121.

In recent years, the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* has shown promise as an organism suitable for the breakdown of a broad spectrum of environmental pollutants, including polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). The focus of this study was to determine whether *P. chrysosporium* could effectively operate in an actual field sample of oil tar-contaminated soil. The soil was loaded with [<sup>14</sup>C]phenanthrene to serve as a model compound representative of the PAHs. Soil with the native flora present under static, aerobic conditions with buffering (pH 5.0 to 5.5) displayed full mineralization on the order of 20% in 21 days. The addition of *P. chrysosporium* was synergistic, with full mineralization on the order of 38% in 21 days. In addition to full mineralization, there was an increase in the proportion of radiolabelled polar extractives, both soluble and bound, in the presence of *P. chrysosporium*. From this study, it is apparent that the native soil microflora can be prompted into full mineralization of PAHs in some contaminated soils and that this mineralization can be enhanced when supplemented with the white rot fungus *P. chrysosporium*. With further refinement, this system may prove an effective bioremediation technology for soils contaminated with PAHs.

91- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-368.

The intent of this review is to provide an outline of the microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. A catabolically diverse microbial community, consisting of bacteria, fungi and algae, metabolizes aromatic compounds. Molecular oxygen is essential for the initial hydroxylation of polycyclic aromatic hydrocarbons by microorganisms. In contrast to bacteria, filamentous fungi use hydroxylation as a prelude to detoxification rather than to catabolism and assimilation. The biochemical principles underlying the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons are examined in some detail. The pathways of polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism are discussed. Studies are presented on the relationship between the chemical structure of the polycyclic aromatic hydrocarbon and the rate of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in aquatic and terrestrial ecosystems.

92- Eaton R W and Chapman P J, 1992, Bacterial metabolism of naphthalene: construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. *J Bacteriol.* 174(23): 7542-7554.

The reactions involved in the bacterial metabolism of naphthalene to salicylate have been reinvestigated by using recombinant bacteria carrying genes cloned from plasmid NAH7. When intact cells of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 carrying DNA fragments encoding the first three enzymes of the pathway were incubated with naphthalene, they formed products of the dioxygenase-catalyzed ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene. These products were separated by chromatography on Sephadex G-25 and were identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry as 2-hydroxychromene-2-carboxylate (HCCA) and trans-*o*-hydroxybenzylidenepyruvate (tHBPA). HCCA was detected as the first reaction product in these incubation mixtures by its characteristic UV spectrum, which slowly changed to a spectrum indicative of an equilibrium mixture of HCCA and tHBPA. Isomerization of either purified product occurred slowly and spontaneously to give an equilibrium mixture of essentially the same composition. tHBPA is also formed from HCCA by the action of an isomerase enzyme encoded by plasmid NAH7. The gene encoding this enzyme, *nahD*, was cloned on a 1.95-kb KpnI-BglII fragment. Extracts of *Escherichia coli* JM109 carrying this fragment catalyzed the rapid equilibration of HCCA and tHBPA. Metabolism of tHBPA to salicylaldehyde by hydration and aldol cleavage is catalyzed by a single enzyme encoded by a 1-kb MluI-StuI restriction fragment. A mechanism for the hydratase-aldolase-catalyzed reaction is proposed. The salicylaldehyde dehydrogenase gene, *nahF*, was cloned on a 2.75-kb BamHI fragment which also carries the naphthalene dihydrodiol dehydrogenase gene, *nahB*. On the basis of the identification of the enzymes encoded by various clones, the gene order for the *nah* operon was shown to be *p, A, B, F, C, E, D*.

93- M A Heitkamp, J P Freeman, D W Miller, and C E Cerniglia, 1988, Pyrene degradation by a *Mycobacterium sp.*: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2556-2565.

The degradation of pyrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon containing four aromatic rings, by pure cultures of a *Mycobacterium sp.* was studied. Over 60% of [<sup>14</sup>C]pyrene was mineralized to CO<sub>2</sub> after 96 h of incubation at 24 degrees C. High-pressure liquid chromatography analyses showed the presence of one major and at least six other metabolites that accounted for 95% of the total organic-extractable <sup>14</sup>C-labeled residues. Analyses by UV, infrared, mass, and nuclear magnetic resonance spectrometry and gas chromatography identified both pyrene *cis*- and *trans*-4,5-dihydrodiols and pyrenol as initial microbial ring-oxidation products of pyrene. The major metabolite, 4-phenanthroic acid, and 4-hydroxyperinaphthenone and cinnamic and phthalic acids were identified as ring fission products. 18O<sub>2</sub> studies showed that the formation of *cis*- and *trans*-4,5-dihydrodiols were catalyzed by dioxygenase and monooxygenase enzymes, respectively. This is the first report of the chemical pathway for the microbial catabolism of pyrene.

94- Mihelcic, J.R., and R.G. Luthy. 1988. Degradation of Polycyclic Aromatic Compounds Under Various Redox Conditions in Soil-Water Systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5): 1182-1187.

95- Phillips, D.H. 1983, Fifty years of benzo[a]pyrène. *Nature*. 303 :468-472.

96- Sims, R.C., et M.R. Overcash. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Rev.* 88:1-68.

97- INERIS, Fiches de données toxicologiques et environnementales disponibles en ligne ([www.ineris.fr](http://www.ineris.fr))

98- H Kiyohara, K Nagao, K Kouno, and K Yano, 1982, Phenanthrene-degrading phenotype of *Alcaligenes faecalis* AFK2, *Appl Environ Microbiol.* 43(2): 458-461.

A phenanthrene-degrading bacterium that assimilated a wide range of organic compounds was isolated from a soil sample and identified as *Alcaligenes faecalis* strain AFK2. The strain degraded phenanthrene through protocatechuate, but did not utilize naphthalene. The phenanthrene-degrading phenotype (Phn<sup>+</sup>) of AFK2 disappeared after 20 successive subcultures in a mineral salts medium containing *o*-phthalate or after subculture in nutrient broth containing mitomycin C. The results suggested that the Phn<sup>+</sup> phenotype of this strain might be encoded by extrachromosomal genes.

99- [www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/](http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/)

## **VIII. LES SOLVANTS CHLORES**

## 1. Propriétés physico-chimiques

Ce sont des composés gazeux (ou de point d'ébullition très bas à pression atmosphérique), facilement volatilisables. Ils sont susceptibles de produire des atomes de chlore qui attaquent la couche d'ozone s'ils peuvent atteindre la stratosphère et s'ils ont une durée de vie suffisamment longue. Le plus simple et le plus abondant de ces composés est le chlorométhane, un organochloré naturel issu très majoritairement des océans et de la combustion de la biomasse.

Certains solvants chlorés (trichloro-1,1,1 éthane et tétrachlorure de carbone principalement) sont interdits par le protocole de Montréal signé en 1987 car impliqués dans la destruction de la couche d'ozone. Le tableau 20 résume quelques propriétés des solvants chlorés dont la pression de vapeur qui caractérise l'aptitude d'une substance active à se volatiliser et la constante de Henry qui définit l'aptitude d'une substance active en solution à se volatiliser.

Nom	Formule	Densité (g/cm <sup>3</sup> ) à 20°C	Solubilité dans l'eau (mg/l) à 20°C	Pression de vapeur (Pa) à 20°C	Constante de Henry (Pa·m <sup>3</sup> /mol) à 20°C	Koc (mg/g)
Tétrachloroéthylène	C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>	1.63	150	1900	1840	364
Trichloréthylène	C <sub>2</sub> HCl <sub>3</sub>	1.46	1100	7960	1044	126
1,2- Dichloroéthane	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	1.48	8520	8433	98,3	14
1,1- Dichloroéthylène	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.22	2250	66500	2630	65
Cis 1,2- Dichloroéthylène	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.28	800	24000	327	49
Trans 1,2- Dichloroéthylène	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.26	600	35300	801	59
Tétrachlorure de Carbone	CCl <sub>4</sub>	1.59	757	12050	0,0214	110
Vinyle Chlorure	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> Cl	0.91	2670	3,3.10 <sup>5</sup>	2730	57

Tableau 20. Propriétés physico-chimiques de solvants chlorés ([www.komex.com/solutions/chlorinatedsolvents.stm](http://www.komex.com/solutions/chlorinatedsolvents.stm))

*Après discussion avec l'association RECORD, un choix s'est porté sur l'étude spécifique de la biodégradation du chlorure de vinyle, des méthanes et éthanes chlorés et non de l'ensemble des processus de biodégradation des solvants chlorés.*

## 2. Propriétés (éco)toxiques et rémanence

Les propriétés (éco)toxiques des solvants chlorés (dont la liste a été définie en concertation avec le Comité de Suivi du projet) sont résumées dans les tableaux 21 et 22.

*\* Les composés organochlorés naturels*

- Le chlorométhane (CH<sub>3</sub>Cl) : agent de méthylation et d'extraction des graisses. C'est un gaz incolore soluble dans l'eau dont les propriétés toxiques et mutagènes sont connues (INRS, 1997). L'Association Européenne des Gaz Industriels souligne l'effet cancérigène suspecté (preuves insuffisantes)

et les conséquences de déversement accidentel dans l'environnement avec des changements de pH des systèmes aqueux.

*\* Les composés organochlorés de synthèse*

- Les solvants chlorés dont les principaux sont le **trichloro-1,1,1éthane** (Agent dégraissant irritant dont la production et l'exportation sont interdites depuis 1996 en Europe – gaz à effet de serre –) et le **tétrachlorure de carbone** (Intermédiaire de synthèse des chlorofluorométhane ayant des propriétés toxique et cancérigène et, dont la production et l'exportation sont interdites depuis 1995 en Europe).

	<b>Effet à court terme DL50 orale rat en mg.kg</b>	<b>Effet à long terme RfC en mg/m<sup>3</sup></b>	<b>Effets sur la reproduction</b>	<b>Genotoxicité (IARC)</b>	<b>Classement UE</b>
Chlorométhane N° CAS 74-873	500-5000	0,09 (rat)	Effets téatogènes chez le rat	Mutagène (Ames) Groupe 3	Catégorie 3
1,1,2- Trichloroéthane N° CAS 79-005	500-5000	0,4	Pas d'effet	Groupe 3	Catégorie 3
1,1,1- Trichloroéthane N° CAS 71-556	> 5000	1	Pas d'effet	Groupe 3	Non classé
1,1,2,2- Tétrachloroéthane N° CAS 79-345	500-5000	Minimal risk inhalation = 3 mg/m <sup>3</sup>	Pas d'effet	Mutagène (Ames) Cancérigène hépatique Groupe 3	Non classé
Chlorure vinyle N° CAS 75-014	500	0,1	Embryotoxique	Groupe 1	Catégorie 1

RfC = inhalation reference concentration

**Tableau 21.** Pathologie – Toxicologie des solvants chlorés (sources : INRS et IARC)

	<b>Effet à court terme (CL50 daphnie 48h)</b>	<b>Effet à long terme (daphnie, reproduction)</b>
	en mg/l	
Chlorométhane N° CAS 74-873	200	ND
1,1,2-Trichloroéthane N° CAS 79-005	64	CE50(21j) = 43
1,1,1-Trichloroéthane N° CAS 71-556	530	ND
1,1,2,2-Tétrachloroéthane N° CAS 79-345	57	NOEC(28j) = 6,9
Chlorure vinyle N° CAS 75-014	103	ND

ND non disponible

**Tableau 22.** Ecotoxicité des solvants chlorés (source : Inchem)

### **3. Principaux mécanismes de dégradation des solvants chlorés**

Deux processus principaux sont impliqués dans la biodégradation des solvants chlorés (SC) :

- i. l'utilisation de la molécule comme source d'énergie** pour la croissance des microorganismes par :
  - oxydation des SC qui jouent le rôle de donneurs d'électrons (exemple du chlorure de vinyle par oxydation aérobie);
  - réduction des SC qui jouent le rôle d'accepteur d'électrons (« halorepiration »);
  - fermentation des SC, dans ce cas le SC sert d'accepteur d'électrons, le phénomène de fermentation étant producteur d'H<sub>2</sub> (donneur d'électrons).
- ii. le cométabolisme lors duquel la molécule est dégradée du fait de l'activité métabolique des organismes.**

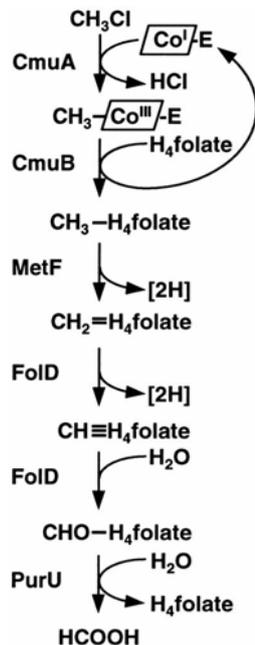
A l'inverse des hydrocarbures, qui peuvent être oxydés par les micro-organismes dans des conditions aérobies ou anaérobies, **les solvants chlorés ne sont dégradés que dans des domaines spécifiques de potentiels d'oxydoréduction** (Denys, 2004). **Les solvants les moins chlorés (dichloroéthylène, chlorure de vinyle) sont les plus susceptibles d'être dégradés en conditions aérobies** (Wiedemeier *et al.*, 1999). **Pour les composés les plus chlorés la dégradation se produit essentiellement par réduction** (US-EPA, 1998).

#### 4. Biodégradation du chlorométhane (CM)

Le Chlorométhane n'est pas facilement biodégradable mais peut être métabolisé par des bactéries adaptées. Le BCF (facteur de bioconcentration) dans les sols est compris entre 2,98 et 3,16. Diverses souches de bactéries aérobies capables de dégrader le CM ont été isolées de divers échantillons environnementaux tels que les sols de forêts (Coulter *et al.*, 1999). Les micro-organismes présents dans les boues de STEP anaérobies sont également capables de dégrader le CM et le DCM (Van Eekert *et al.*, 1998).

Un nombre important de micro-organismes aérobies capables de croître avec du CM ont été isolés mais seuls deux mécanismes de déhalogénéation ont été étudiés en détail. La bactérie méthylotrophique *Hyphomicrobium sp.* a été isolée de décharges industrielles par Hartmans *et al.* (1986).

**Vanelli *et al.* (1998 ; 1999) ont proposé une voie métabolique du chlorométhane par la souche CM4 de *Methylobacterium sp.* qui aboutit à la formation d'acide formique.**



**Figure 10.** Voie d'oxydation du chlorométhane en acide formique avec CmuA, méthyltransferase I; CmuB, méthyltransferase II; MetF, putative 5,10-méthylène- $\text{H}_4\text{folate}$  reductase; FoID, putative 5,10-méthylène- $\text{H}_4\text{folate}$  dehydrogenase/5,10-méthényle- $\text{H}_4\text{folate}$  cyclohydrolyase; PurU, putative 10-formyl- $\text{H}_4\text{folate}$  hydrolase.

Deux autres souches méthylotrophes (*Hyphomicrobium chloromethanicum sp.* et *Methylobacterium chloromethanicum sp.*) ont été isolées de sols industriels pétrochimiques russes par McDonald *et al.* (2001) et sont capables de dégrader le CM en acide formique.

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa NB1* utilise le CM comme source nutritive en conditions nitrate-réductrice et aérobie (Freedman *et al.*, 2004). En conditions anoxiques, le taux de consommation du CM maximal par la souche NB1 est de  $5 \mu\text{mol/mg}$  Matières en Suspension / jour avec un taux de croissance spécifique de  $0,0506 \text{ j}^{-1}$ . En atmosphère aérobie, les taux de consommation et de croissance sont de  $10,7 \mu\text{mol/mg}$  de SST/ jour et  $0,145 \text{ j}^{-1}$  respectivement. Les produits obtenus ne sont pas précisés dans la publication. **Ainsi, la souche NB1 dégrade préférentiellement le CM en conditions aérobies.**

Harper (2000) a étudié la dégradation biologique de ce composé en conditions aérobie et anérobie. La bactérie méthylotrophique *Acetobacterium dehalogenans*, isolée à partir de boues de STEP, est capable de métaboliser le CM en absence d' $\text{O}_2$  strictement. La déhalogénéation anoxique du CM est catalysée par une enzyme méthyltransferase.

**Les travaux publiés montrent que la biodégradation du chlorométhane est possible en milieu aérobie et anaérobie mais préférentiellement en conditions d'anaérobiose.**

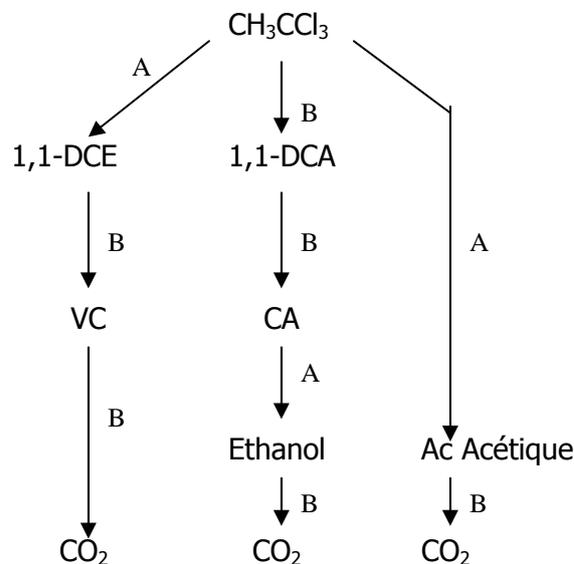
## **5. Biodégradation des éthanes chlorés**

Les éthanes chlorés lourds sont connus comme étant dégradés par co-métabolisme en conditions aérobie et anaérobie dans l'environnement (Field et Sierra-Alvarez, 2004). Par exemple, le 1,1,1-TCA est utilisé comme accepteur terminal d'électron par certaines bactéries du sol.

### *a. Le trichloroéthane*

Le 1,1,1-Trichloroéthane (TCA) présent de manière ubiquitaire dans les écosystèmes, reste difficile à dégrader biologiquement. Seul Oldenhuis *et al.* (1989) ont montré que le TCA pouvait être transformé par voie aérobie par la bactérie méthanotrophe *Methylosinus trichosporium* OB3b par l'intermédiaire d'une méthane-monooxygenase.

En condition anaérobie, la transformation du TCA se produit seulement après une longue période d'acclimatation (10-12 semaines) et avec des concentrations inférieures à 1 µM (de Best *et al.*, 1997).



**Figure 11.** Transformations abiotique (A) et biotique (B) du TCA en conditions méthanogènes (VC : Vinyl Chloride ; CA : Chloroéthane ; DCE : Dichloroéthylène) d'après RD Norris, 1994

**Le métabolite principal issu de la biotransformation anaérobie du TCA par *Clostridium sp.* est le 1,1-Dichloroéthane (DCA)** (Galli et McCarty, 1989) mais, il est possible d'avoir une conversion en Chloroéthane (CA) et une complète déchloration en CO<sub>2</sub> et/ou la formation d'acide acétique par un consortium méthanogène (J. H. de Best *et al.*, 1999) et avec *Dehalobacter sp.* (souche TCA1) (Sun *et al.*, 2002).

Yagi *et al.* (1999) ont étudié le co-métabolisme du TCA chez 2 souches de *Mycobacterium spp.* isolées à partir de sols contaminés par du tetrachloroéthylène et en présence d'éthane

comme source de carbone (Yagi *et al.*, 1999). Les souches sont capables de dégrader en présence d'oxygène des concentrations de l'ordre de 25 à 75 mg/l de TCA lors d'expérimentations en batch.

La seule étude concernant la dégradation du 1,1,2-trichloroéthane dans le sol est citée par ATSDR, US Public Health Service dans un rapport sur le 1,1,2-trichloroéthane (1989) et implique des échantillons de surface prélevés sur une plaine d'inondation près de Lula, l'Oklahoma (Wilson *et al.*, 1983 cité par ATSDR, US Public Health Service, 1989). Ces échantillons ont été obtenus au niveau d'une couche aquifère peu profonde. Une partie du sol a été stérilisée et des boues ont été introduites avec addition du produit chimique d'essai. Après 16 semaines d'incubation, aucune dégradation du 1,1,2-trichloroéthane n'a été observée dans les échantillons de la zone humide. Ces résultats sont en désaccord avec d'autres études. La durée de l'expérimentation a pu être insuffisante pour que les micro-organismes présents s'acclimatent au produit chimique et y puisent leurs sources de carbone.

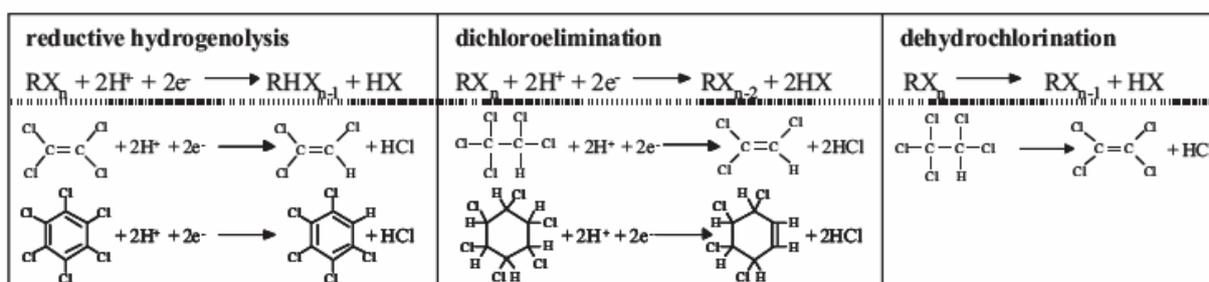
Des expériences ont été réalisées dans des conditions anoxiques en utilisant desensemencements à partir d'unités anaérobies de digesteur de traitement des eaux résiduaires qui n'ont pas été acclimatés aux solvants industriels. Après 1 semaine d'incubation avec 10 µg/L de 1,1,2-trichloroéthane, 0,44 µg/g de chlorure de vinyle a été formé (Hallen *et al.*, 1986 cité par ATSDR, US Public Health Service, 1989).

Dans d'autres expériences quand la concentration de l'ensemencement a été augmentée, 4,3 et 5,8 µg/g de chlorure de vinyle ont été formés après 1 et 2 semaines, respectivement. Les réactions de dégradation observées incluent le processus de deshalogénéation réductrice et la transformation des éthanes chlorés en éthènes. Des échantillons stérilisés pour une expérience anaérobie de biodégradation du 1,1,2-trichloroéthane ont produit du 1,1-dichloroéthène (Molton *et al.*, 1987 cité par ATSDR, US Public Health Service, 1989). La formation du 1,1-dichloroéthène indique que la conversion du 1,1,2-trichloroéthane est non biologique.

### b. Le tétrachloroéthane

Trois voies de dégradation en conditions anaérobies des solvants chlorés existent et sont résumées dans les travaux de House (2002) et dans le tableau 23 :

- i. le remplacement d'un atome de chlore par un atome d'hydrogène ;
- ii. la dichloroélimination, la perte de 2 atomes de chlore et d'un hydrogène, avec la formation d'un alcène ;
- iii. la déshydrochlorination est une réaction d'élimination abiotique.



**Tableau 23.** Exemples de réactions de déchloration en conditions anaérobies (van Eekert et Schraa, 2001)

Le tétrachloroéthane est converti en éthènes chlorés par action des micro-organismes présents. Plusieurs études ont examiné la biodégradation du TeCA en conditions anaérobies par des mélanges de cultures méthanogènes et sont présentées dans le tableau 24:

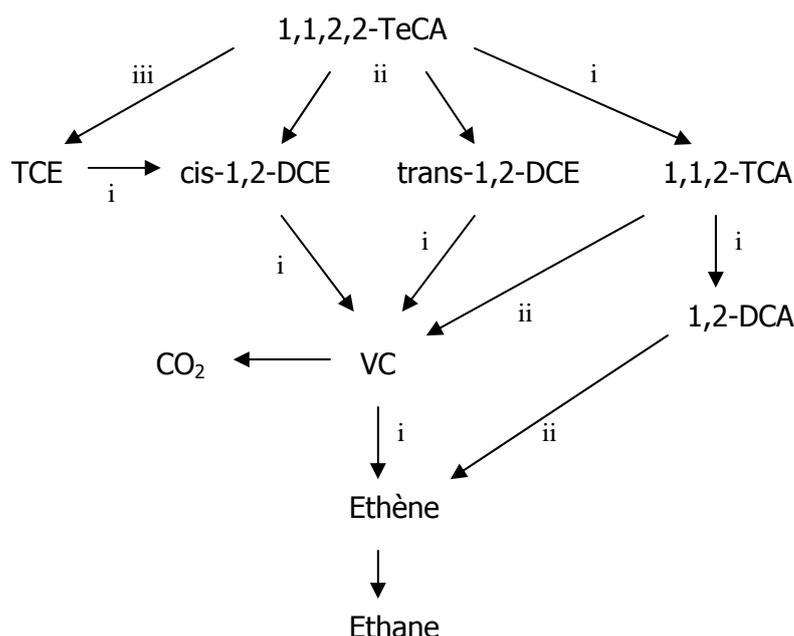
Composé	Culture	Elimination du composé parent (%)	Produits * récupéré (% mol)	Références
1,1,1,2-TeCA	Boues granulaires méthanogènes issues réacteur anaérobie	100	1,1-DCE (35) ; VC (8)	Van Eekert et al., 1999 cité par Field et Sierra-Alvarez
1,1,2,2-TeCA	Boues granulaires méthanogènes issues réacteur anaérobie	96	DCE (73) : cis (41) + trans (32) ; VC (11) ; TCE (7) + E + A	Van Eekert et al., 1999 cité par Field et Sierra-Alvarez
1,1,2,2-TeCA	Culture enrichie	Non quantifié	DCE : cis + trans ; TCE	Löffler et al., 1997

\* TCE : trichloroéthylène ; DCE : Dichloroéthène ; VC : chlorure de vinyle ; E : éthène ; A : éthane

**Tableau 24.** Produits de dégradation du tétrachloroéthane

Les travaux de House (2002) ont montré que les métabolites majeurs issus de la biodégradation anaérobie du TeCA dans des sols humides en microcosmes sont les isomères DCE, le chlorure de vinyle et l'éthène. La concentration utilisée dans les expérimentations est de 10 mg TeCA/L. Le temps de 1/2 vie du TeCA dans des échantillons de surface est de 23 à 95 jours.

**Figure 12.** Voie de dégradation du 1,1,2,2-TeCA d'après House, 2002



- i. le remplacement d'un atome de chlore par un atome d'hydrogène ;
- ii. la dichloroélimination, la perte de 2 atomes de chlore et d'un hydrogène, avec la formation d'un alcène ;
- iii. la déshydrochlorination est une réaction d'élimination abiotique.

Les expérimentations de Lien et Zhang (2005) en batch ont montré que l'hydrodechlorination du TeCA (concentration initiale = 20-30 mg/l) en présence de nanoparticules bimétalliques (Pd/Fe = 0,25 g) et à température ambiante après 24 h donnaient en produits finaux de l'éthane (61 %) et de l'éthylène (16 %).

Il est montré que le TeCA est également dégradé par halorespiration par la bactérie *Desulfotobacterium sp.* T51 formant divers isomères de DCE comme produits de réaction (Suyama *et al.*, 2002). L'enzyme dehalogénase montre des activités de 42 et 773 nmol/mg prot/min pour le 1,1,1,2 et le 1,1,2,2-TeCA respectivement.

Enfin, les deux isomères de TeCA sont cooxydés par voie aérobie sous l'action de la bactérie nitrifiante *Nitrosomonas europaea* qui dégrade également le TCA (Rasche *et al.*, 1991 cité par Field et Sierra-Alvarez, 2004). Le 1,1,1,2-TeCA est ainsi converti en chloral (trichloroéthanal).

## 6. Biodégradation du chlorure de vinyle (CV)

A quelques exceptions près, le chlorure de vinyle n'est pas facilement dégradé par les groupements de microorganismes inadaptés dans les conditions ambiantes (1 atm, 25°C). La demi-vie de biodégradation par des micro-organismes non acclimatés est de l'ordre de plusieurs mois ou années (fiche Ineris). Toutefois, certaines cultures microbiennes enrichies ou pures (par exemple *Mycobacterium sp.*) sont capables de décomposer le chlorure de vinyle lorsque les conditions culturales sont optimales. Le métabolisme aérobie de ce composé peut suivre 2 voies :

- une voie directe intracellulaire passant par un composé intermédiaire dégradé lui-même en composés ultimes (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O) : Hartmans et de Bont (1992) ont isolé à partir de sols contaminés une souche *M. aureum* L1 capable de métaboliser le CV. L'action d'une monooxygénase transforme le CV en époxyde réactif chlorooxirane, un composé très instable intracellulaire (1/2 vie de 1,6 min dans un tampon TRIS-HCl à pH 7,4 et à 37°C), se réarrangeant en chloroacétaldéhyde puis en CO<sub>2</sub>. Davis et Carpenter (1990) ont également montré la biodégradation du CV marqué au <sup>14</sup>C dans des échantillons issus d'un système aquifère superficiel. Le CV (1 ppm initial) est dégradé à plus de 99 % après 108 jours avec approximativement 65 % minéralisé en CO<sub>2</sub>.

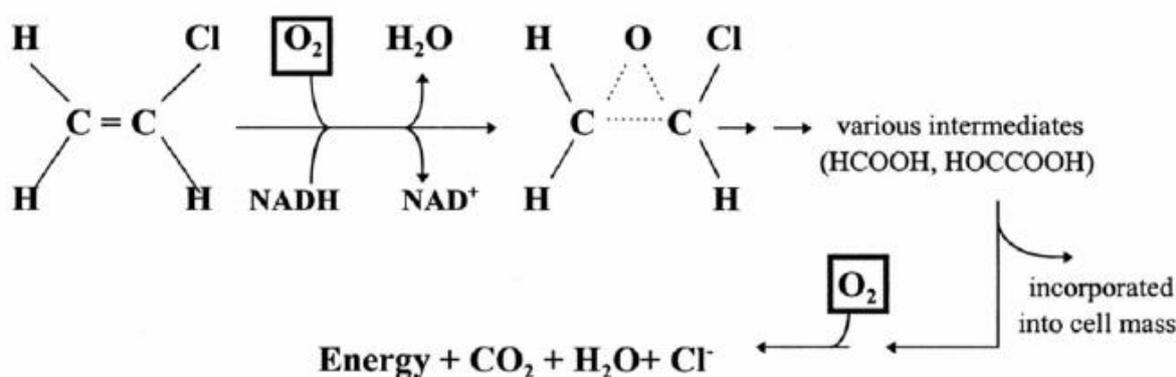
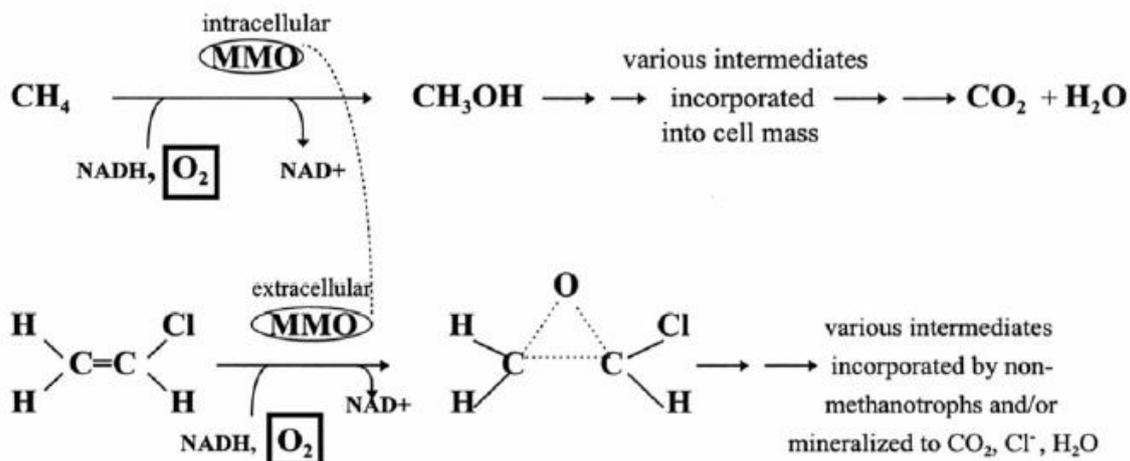


Figure 13. Dégradation aérobie intracellulaire du chlorure de vinyle : bénéfice net énergétique pour l'organisme dégradant (d'après [www.regeneris.com/ORCTech/Tb2223.htm](http://www.regeneris.com/ORCTech/Tb2223.htm))

- Une voie méthanotrophe extracellulaire via un co-métabolisme : McCarty (1994, cité dans le document de *regeneris*) la formation du chlorooxirane est observée en présence de méthane (co-substrat) par l'intermédiaire de méthane\_monooxygénase qui sont excrétées par la cellule et dégrade le CV dans le milieu.



**Figure 14. Dégradation aérobie extracellulaire du chlorure de vinyle : pas de bénéfice énergétique pour l'organisme méthanotrophe produisant les enzymes (d'après [www.regeneris.com/ORCtech/Tb2223.htm](http://www.regeneris.com/ORCtech/Tb2223.htm))**

Le CV peut également être dégradé par voie anaérobie. Cornuet (2000) a expérimenté sur site pilote (puits creusés à différentes profondeurs) « côte à côte » la dégradation du CV (220 to 5700 µg/l) par voie aérobie (enrichissement O<sub>2</sub>) et anaérobie (enrichissement H<sub>2</sub>). Après 180 jours, une dégradation effective est observée dans les puits à 7,6 mètres de profondeur avec une moyenne de 76% de CV dégradé par voie aérobie et 96% pour l'essai anaérobie.

La flore anaérobie rencontrée appartient à diverses familles microbiennes telles que *Clostridium sp.* (Hata *et al.*, 2004, isolats de sédiments d'étang recevant des lixiviats de remblais), *Dehalococcoides sp.* (Müller *et al.*, 2004, déhalogénéation réductrice du CV en éthène).

## 7. (Eco)toxicité des métabolites

L'objectif de cette partie du travail consistait à appréhender les produits issus de la dégradation de solvants chlorés ciblés par le comité scientifique de suivi de l'étude. Le tableau 25 résume les toxicités des solvants étudiés et de leurs métabolites en tenant compte des résultats de génotoxicité et des effets écotoxiques.

**Il est à considérer lors de pollution du compartiment terrestre la présence des composés chlorés suivants pouvant produire des métabolites toxiques :**

- chlorométhane
- 1,1,2-Trichloroéthane
- 1,1,1,2-Tetrachloroéthane
- 1,1,2,2-Tetrachloroéthane
- chlorure de vinyle

**Cependant deux remarques sont à prendre en considération :**

- 1) la dégradation des molécules ciblées comme « à risque » (les 4 citées ci-dessus) excepté pour le chlorométhane est dépendante des conditions environnementales. En effet, la biodégradation anaérobie mise en jeu lors des protocoles nécessite la présence de micro-organismes

**susceptibles de croître en absence d'oxygène. Cette remarque est donc à prendre en considération dans le phénomène d'atténuation naturelle, les conditions anoxiques étant à éviter pour limiter la formation des métabolites « à risque ».**

- 2) Il est important de tenir compte des **propriétés de volatilité des produits cancérogènes obtenus c'est à dire le formaldéhyde et le chlorure de vinyle** car cela suppose, si les concentrations sont importantes, une surveillance des populations à proximité des sites contaminés qui seraient directement exposées (par inhalation) à ces gaz.
- 3) **Les transformations intra et extracellulaires** des composés permettent une libération ou non des métabolites « à risque », par exemple, le chlorooxirane (un epoxyde) est présent au niveau extracellulaire lors de la co-oxxydation du chlorure de vinyle.

Les métabolites obtenus sont souvent analysés par chromatographie gazeuse dans des expérimentations en batch. De plus, le procédé de biodégradation est dans la plupart des cas étudiés en condition anaérobie et ne peut être envisagé dans la décontamination de sites qu'avec un certain nombre de conditions particulières dont la récupération des métabolites volatils hautement toxiques.

Molécule parente	N°CAS	Toxicité molécule- parente						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites					Localisation	Références	
		PNEC aqu µg/l	IARC	CE	DL50 orale mg/kg*	Niveau Toxicité CE	BCF mesuré ou estimé					PNEC aqu µg/l (calcul)	IARC	CE	DL50 orale mg/kg	Niveau Toxicité orale CE			BCF mesuré ou estimé
Chlorométhane Solubilité eau (25°C): 5320mg/l P° vapeur à 25°C : 573 kPa Log Kow : 0,91	74-87-3	550 calcul	3	Cat 3	1800	Nocif	3	<i>Methylobacterium sp.</i>	Voie aérobie Température = 30°C pH = 7,2 (ajout NaOH 5M) [CH3Cl]final = 2% vol/vol Taux de croissance = 0,12 h <sup>-1</sup>	Formaldéhyde Solubilité eau (20°C): 400g/l P° vapeur à 25°C : 518 kPa Log Kow : 0,35	50-00-0	0,066	1	Cat 3	100	Toxique	ND Très volatile	intracellulaire	Vanelli <i>et al.</i> , 1998 ; 1999
										Acide formique Solubilité eau (20°C): 1000 g/l P° vapeur à 25°C : 5678 Pa Log Kow : -0,54	64-18-6	34	Non classé	Non classé	730	Nocif	3,2	??	
										CO <sub>2</sub> Solubilité eau (20°C):88ml/100ml P° vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat		22,5	extracellulaire	
Chlorométhane	74-87-3	550 calcul	3	Cat 3	1800	Nocif	3	<i>Acetobacterium dehalogenans</i> souche MC	Voie anaérobie en batch Température = 25°C pH = 7,3-7,7 [CH3Cl]final = 2-3 % dans la phase gazeuse Taux de croissance = ??	10-Formyltetrahydrofolate	2800-34-2	ND	Non classé	Non classé	Précurseur synthèse nucléotides		ND	intracellulaire	Messmer <i>et al.</i> , 1993 cité par de Best, 1999
										Acide formique Solubilité eau (20°C): 1000 g/l P° vapeur à 25°C : 5678 Pa Log Kow : -0,54	64-18-6	34	Non classé	Non classé	730	Nocif	3,2	??	
										CO <sub>2</sub> Solubilité eau (20°C):88ml/100ml P° vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat		22,5	extracellulaire	
1,1,1-Trichloroéthane Solubilité eau (25°C): 1290mg/l P° vapeur à 25°C : 16,5 kPa Log Kow : 2,49	71-55-6	52,8 calcul	3	Non classé	9600	Non toxique	8,9	<i>Mycobacterium TA27</i>	Voie aérobie en batch Température = 25°C pH = 7 [éthane/air] = 2/8 [TCA] = gamme 0,5 à 50 mg/l [cellules]final = 0,64 mg/l	Trichloroacétate Solubilité eau (25°C): 44 g/l P° vapeur à 20°C : ?? Log Kow : 1,33	76-03-9	2000	3	Non classé	400	Nocif	1,7 (poisson)	intracellulaire	Oldenhuis <i>et al.</i> , 1989 Hashimoto <i>et al.</i> , 2002
										Acide formique Solubilité eau (20°C): 1000 g/l P° vapeur à 25°C : 5678 Pa Log Kow : -0,54	64-18-6	34	Non classé	Non classé	730	Nocif	3,2	??	
										Acide dichloroacétique Solubilité eau (20°C): 1000 g/l P° vapeur à 25°C : 23,9 Pa Log Kow : 0,92	79-43-6	ND	3	Non classé	2820	Faible	3	??	
										CO <sub>2</sub> Solubilité eau (20°C):88ml/100ml P° vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat		22,5	extracellulaire	
1,1,1-Trichloroéthane	71-55-6	52,8 calcul	3	Non classé	9600	Non toxique	8,9	<i>Dehalobacter sp.</i>	Voie anaérobie en conditions méthanogènes	1,1-Dichloroéthane Solubilité eau (25°C): 5040 mg/l P° vapeur à 25°C : 30 kPa Log Kow : 1,79	75-34-3	320	3	Non classé	725	Nocif	5	intracellulaire	Sun <i>et al.</i> , 2002
										Chloroéthane Solubilité eau (25°C): 5,7 g/l P° vapeur à 20°C : 134 kPa Log Kow : 1,43	75-00-3	ND	3	Cat 3	>5000	Non toxique	2,5	intracellulaire	
										Acétaldéhyde Solubilité eau (25°C): 1000 g/l P° vapeur à 25°C : 120 kPa Log Kow : -0,34	75-07-0	ND	3	Cat 3	661	Nocif	3	intracellulaire	
										CO <sub>2</sub> Solubilité eau (20°C):88ml/100ml P° vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat		22,5	extracellulaire	
1,1,2-Trichloroéthane Solubilité eau (25°C): 4590mg/l P° vapeur à 25°C : 3 kPa Log Kow : 1,89	79-00-5	81,6 calcul	3	Cat 3	100	Toxique	<1	<i>Dehalobacter sp. Dehalococcoides spp.</i>	Voie anaérobie en microcosme Mélange CO2/H2/N2 = 10%/10%/80% [TCA] = 0,3 mM	Chlorure de vinyle Solubilité eau (25°C): 8,8g/l P° vapeur à 20°C : 3,3.10 <sup>5</sup> Pa Log Kow : 1,62	75-01-4	ND	1	Cat 1	500	Nocif	10	??	Grostern <i>et Edwards</i> , 2006
										Ethylène Solubilité eau (25°C): 131 mg/l P° vapeur à 25°C : ?? Log Kow : 1,13	74-85-1	53	3	Non classé	>5000	Non toxique	4	extracellulaire	

Molécule parente	N°CAS	Toxicité molécule- parente						Micro-organismes	Conditions opératoires	Métabolites	N°CAS métabolites	Toxicité des métabolites						Localisation	Références
		20 calcul	3	Non classé	800	Nocif	12					3	Cat 3	200	Toxique	<13	??		
1,1,1,2-Tetrachloroéthane Solubilité eau (25°C): 1070mg/l P° vapeur à 25°C : 1599 Pa Log Kow : 2,93	630-20-6	20 calcul	3	Non classé	800	Nocif	12	Microflore méthanogène	Voie anaérobie Boues granulaires issues de bioréacteurs	1,1-Dichloroéthylène Solubilité eau (25°C): 2420 mg/l P° vapeur à 25°C : 80 kPa Log Kow : 2,13	75-35-4	220	3	Cat 3	200	Toxique	<13	??	Van Eekert et Schraa, 2001
										Chlorure de vinyle Solubilité eau (25°C): 8,8g/l P° vapeur à 20°C : 3,3.10 <sup>5</sup> Pa Log Kow : 1,62	75-01-4	ND	1	Cat 1	500	Nocif	10	??	
1,1,2,2-Tetrachloroéthane Solubilité eau (25°C): 2830mg/l P° vapeur à 25°C : 616 Pa Log Kow : 2,39	79-34-5	140	3	Non classé	200	Toxique	8	Population microbienne du sol	Voie anaérobie en microcosme sol + eau souterraine du site contaminé (transport 4°C) [TeCA]eau souterraine = 80,2 µmol/l Atmosphère saturé en N <sub>2</sub> Température = 18-22°C pHeau = 6,5 Période d'incub = 384 jrs	Chlorure de vinyle Solubilité eau (25°C): 8,8g/l P° vapeur à 20°C : 3,3.10 <sup>5</sup> Pa Log Kow : 1,62	75-01-4	ND	1	Cat 1	500	Nocif	10	??	Aulenta et al, 2006; Lorah et Voytek, 2004
										Ethylène Solubilité eau (25°C): 131 mg/l P° vapeur à 25°C : ?? Log Kow : 1,13	74-85-1	53	3	Non classé	>5000	Non toxique	4	extracellulaire	
Chlorure de vinyle Solubilité eau (25°C): 8,8 g/l P° vapeur à 20°C : 3,3.10 <sup>5</sup> Pa Log Kow : 1,62	75-01-4	ND	1	Cat 1	500	Nocif	10	Microflore méthanotrophe	Voie aérobie Co-métabolisme en présence de méthane (co-substrat)	Chlorooxirane Solubilité eau (25°C): ?? P° vapeur à 25°C : ?? Log Kow : ??	7763-77-1	ND	??	??	??	??	??	??	McCarty (1994, cité dans le document de regeneris
										CO <sub>2</sub> Solubilité eau (20°C):88ml/100ml P° vapeur à 20°C : 5720 kPa Log Kow : 0,83	124-38-9	20	Non classé	Non classé	Asphyxiant à partir de 30% (air) chez rat	22,5	extracellulaire		

■ Molécule classée comme cancérogène par l'IARC

ND Non déterminé; PNEC Previsible Non Effect Concentration ; BCF Facteur de bioaccumulation ; \* valeurs trouvées sur Toxnet (<http://chem.sis.nlm.nih.gov/>)

Sources : HSDB, INERIS, Inchem, Google

Tableau 25. Rappel des propriétés (éco)toxiques des solvants chlorés et de leurs principaux métabolites

## 8. A retenir

L'étude du devenir des méthane et éthane chlorés dans les sols contaminés se différencie selon la présence ou non d'oxygène car dans la plupart des cas la biodégradation est anaérobie, surtout pour les plus chlorés. Deux processus principaux sont impliqués dans la biodégradation des SC : l'utilisation de la molécule comme source d'énergie pour la croissance des microorganismes et le cométabolisme lors duquel la molécule est dégradée du fait de l'activité métabolique des organismes.

### Le chlorométhane :

Il peut être dégradé en conditions aérobie et anaérobie. Une multitude d'espèces bactériennes présentes dans le sol et les sédiments sont capables d'utiliser le chlorométhane comme source d'énergie. **La voie aérobie semble plus préoccupante car elle induit la formation de formol.**

### Les trichloroéthanes :

Le 1,1,1-TCA peut être dégradé par co-métabolisme en conditions aérobie et anaérobie dans l'environnement. La biodégradation passe par une simplification moléculaire avec clivage des atomes chlorés. Ainsi, les principaux métabolites sont des acides et le dioxyde de carbone.

**Le 1,1,2-TCA est dégradé en conditions anoxiques et donne comme intermédiaire métabolique le chlorure de vinyle.**

### Les tétrachloroéthanes :

Les travaux de House (2002) ont montré que les métabolites majeurs issus de **la biodégradation anaérobie des TeCA dans des sols humides en microcosmes sont les isomères de DCE, le chlorure de vinyle et l'éthène.**

### Le chlorure de vinyle :

A quelques exceptions près, **le chlorure de vinyle n'est pas facilement dégradable** par les groupements de microorganismes inadaptés dans les conditions ambiantes (1 atm, 25°C). Toutefois, **certaines cultures microbiennes** enrichies ou pures (par exemple *Mycobacterium sp.*) **sont capables de décomposer** le chlorure de vinyle. Le métabolisme aérobie de ce composé peut suivre 2 voies : **une voie directe intracellulaire** passant par un composé intermédiaire dégradé lui-même en composés ultimes (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O) et **une voie méthanotrophe extracellulaire** via un co-métabolisme. Le CV peut également être dégradé par voie anaérobie. La flore anaérobie rencontrée appartient à diverses familles telles que *Clostridium sp.* et *Dehalococcoides sp.*

### Propriétés des métabolites :

Les solvants ciblés lors de l'étude sont tous dégradables. La destruction des molécules par des micro-organismes résulte d'une simplification par clivage des atomes de chlore, et conduit à la formation de métabolites dont la structure chimique est moins complexe que la molécule parente. Il faut noter **la formation d'intermédiaires toxiques tels que le chlorure de vinyle** ayant un caractère cancérigène reconnu **dont la localisation dans la cellule (intra ou extracellulaire) reste peu précisée** dans les travaux. La formation de formaldéhyde, au niveau intracellulaire, a été rapportée lors de la biodégradation du chlorométhane. Parmi les métabolites excrétés, le CO<sub>2</sub> gazeux se dissémine dans l'air et l'éthylène va interagir avec les végétaux. Néanmoins, beaucoup des métabolites identifiés sont intracellulaires ou bien aucune indication n'est précisée (par exemple, aucune précision n'est apportée sur le chlorure de vinyle et sa localisation lorsqu'il apparaît en milieu du chaînon métabolique).

## 9. Références bibliographiques sur la biodégradation des solvants chlorés

**NB les références indiquées sont celles citées dans le document et ne représente qu'une partie de la bibliographie réunie pour l'étude**

100- [www.inrs.fr](http://www.inrs.fr)

101- [www.epa.gov](http://www.epa.gov)

102- [www.inchem.org](http://www.inchem.org)

103- Lien Hsing-Lung et Zhang Wei-xian, 2005, Hydrodechlorination of Chlorinated Ethanes by Nanoscale Pd/Fe Bimetallic Particles, *J. Envir. Engrg.*, Volume 131, Issue 1, pp. 4-10.

Chlorinated ethanes are contaminants commonly found in soil and groundwater. The potential of nanoscale bimetallic (Fe/Pd) particles for the hydrodechlorination of seven chlorinated ethanes (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>-xCl<sub>x</sub>) was evaluated in batch experiments. Hexachloroethane (HCA) (C<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub>), pentachloroethane (PCA) (C<sub>2</sub>HCl<sub>5</sub>), 1,1,2,2-tetrachloroethane (1,1,2,2-TeCA, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>), and 1,1,1,2-tetrachloroethane (1,1,1,2-TeCA, C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub>) were rapidly hydrodechlorinated (9–28 min half-lives) at a nanoparticle loading of 5 g/L. End products were ethane (61–87%) and ethylene (6–16%). Only one chlorinated intermediate, a corresponding -elimination product, appeared temporarily during the reactions. Reductive dechlorination of 1,1,1-trichloroethane (1,1,1-TCA, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>Cl<sub>3</sub>) to ethane was completed at a relatively slower rate with half-life at 44.9 min. Little reduction of dichloroethane (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>) was observed within 24 h. The Pd/Fe bimetallic nanoparticles generally exhibit much higher reactivity when compared with conventional micro- and millimeter scale iron powders. The hydrodechlorination reactions are more complete, with a much higher yield of ethane and lower yield of chlorinated byproducts. A kinetic model incorporating a transition state species was proposed. Results from this work suggest that the Pd/Fe bimetallic nanoparticles may represent a treatment alternative for *in situ* remediation of chlorinated ethanes.

104- Denys S, 2004, Biodégradation des solvants chlorés en conditions naturelles, Rapport INERIS, 33p. *disponible sur le site de l'INERIS*

105- J.A. Field and R. Sierra-Alvarez, 2004. Biodegradability of chlorinated solvents and related chlorinated

aliphatic compounds. *Reviews in Environmental Science & Biotechnology* 3: 185–254

The biodegradability of chlorinated methanes, chlorinated ethanes, chlorinated ethenes, chlorofluorocarbons (CFCs), chlorinated acetic acids, chlorinated propanoids and chlorinated butadienes was evaluated based on literature data. Evidence for the biodegradation of compounds in all of the compound categories evaluated has been reported. A broad range of chlorinated aliphatic structures are susceptible to biodegradation under a variety of physiological and redox conditions. Microbial biodegradation of a wide variety of chlorinated aliphatic compounds was shown to occur under five physiological conditions. However, any given physiological condition could only act upon a subset of the chlorinated compounds. Firstly, chlorinated compounds are used as an electron donor and carbon source under aerobic conditions. Secondly, chlorinated compounds are cometabolized under aerobic conditions while the microorganisms are growing (or otherwise already have grown) on another primary substrate. Thirdly, chlorinated compounds are also degraded under anaerobic conditions in which they are utilized as an electron donor and carbon source. Fourthly, chlorinated compounds can serve as an electron acceptor to support respiration of anaerobic microorganisms utilizing simple electron donating substrates. Lastly chlorinated compounds are subject to anaerobic cometabolism becoming biotransformed while the microorganisms grow on other primary substrate or electron acceptor. The literature survey demonstrates that, in many cases, chlorinated compounds are completely mineralised to benign end products. Additionally, biodegradation can occur rapidly. Growth rates exceeding 1 d<sup>-1</sup> were observed for many compounds. Most compound categories include chlorinated structures that are used to support microbial growth. Growth can be due to the use of the chlorinated compound as an electron donor or alternatively to the use of the chlorinated compound as an electron acceptor (halorespiration). Biodegradation linked to growth is important, since under such conditions, rates of degradation will increase as the microbial population (biocatalyst) increases.

Combinations of redox conditions are favorable for the biodegradation of highly chlorinated structures that are recalcitrant to degradation under aerobic conditions. However, under anaerobic conditions, highly chlorinated structures are partially dehalogenated to lower chlorinated counterparts. The lower chlorinated compounds are subsequently more readily mineralized under aerobic conditions.

106- Freedman, David L *et al.* (2004) Biodegradation of chloromethane by *Pseudomonas aeruginosa* strain NB1 under nitrate-reducing and aerobic conditions *Appl Environ Microbiol* 70:4629-34

107- Hata J, Miyata N, Kim ES, Takamizawa K, Iwahori K, 2004, Anaerobic degradation of cis-1,2-dichloroethylene and vinyl chloride by *Clostridium sp.* strain DC1 isolated from landfill leachate sediment, *J Biosci Bioeng.* 97(3):196-201.

The bacterial community structure of anaerobic enrichment cultures that are capable of degrading both cis-1,2-dichloroethylene (cis-DCE) and vinyl chloride (VC) and isolation of the organism responsible for the degradation were investigated. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of a PCR-amplified 16S rRNA gene from the cultures showed the possible predominance of *Clostridium* species. One isolate, designated strain DC1, was closely related to members of Clostridiaceae, based on 16S rRNA gene analysis, and the highest sequence similarity (98.9%) was obtained for *Clostridium saccarobutylicum*. In culture experiments, strain DC1 was shown to degrade cis-DCE and VC during the stationary phase of growth without accumulation of VC and/or ethene. The bacterial growth was not linked to the degradation of cis-DCE and VC. Stoichiometric analysis revealed that two moles of chloride ions as released from one mole of cis-DCE during the incubation period, indicating that cis-DCE was fully dechlorinated. The results appear consistent with the presence of a mechanism of oxidative dechlorination rather than respiratory reductive dechlorination; the latter is accompanied by transient formation of dechlorinated ethenes from cis-DCE and VC.

108- House JS, 2002, Enhanced bioremediation of 1,1,2,2-tetrachloroethane in wetland soils, thesis, Faculty of the Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College. Disponible sur [http://etd.lsu.edu/docs/available/etd1114102154731/unrestricted/House\\_thesis.pdf#search=%22house%202002%20study%20biodegradation%20tetrachloroethane%22](http://etd.lsu.edu/docs/available/etd1114102154731/unrestricted/House_thesis.pdf#search=%22house%202002%20study%20biodegradation%20tetrachloroethane%22)

109- Muller, J. A., Rosner, B. M., von Abendroth, G., Meshulam-Simon, G., McCarty, P. L., Spormann, A. M. (2004). Molecular Identification of the Catabolic Vinyl Chloride Reductase from *Dehalococcoides sp.* Strain VS and Its Environmental Distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4880-4888.

110- Sun B, Griffin BM, Ayala-del-Rio HL, Hashsham SA, Tiedje JM, 2002, Microbial dehalorespiration with 1,1,1-trichloroethane, *Science.* 298(5595):1023-5.

1,1,1-Trichloroethane (TCA) is a ubiquitous environmental pollutant because of its widespread use as an industrial solvent, its improper disposal, and its substantial emission to the atmosphere. We report the isolation of an anaerobic bacterium, strain TCA1, that reductively dechlorinates TCA to 1,1-dichloroethane and chloroethane. Strain TCA1 required H<sub>2</sub> as an electron donor and TCA as an electron acceptor for growth, indicating that dechlorination is a respiratory process. Phylogenetic analysis indicated that strain TCA1 is related to gram-positive bacteria with low DNA G+C content and that its closest relative is *Dehalobacter restrictus*, an obligate H<sub>2</sub>-oxidizing, chloroethene-respiring bacterium.

111- Akiko Suyama, Masaki Yamashita, Sadazo Yoshino, et Kensuke Furukawa, Molecular Characterization of the PceA Reductive Dehalogenase of *Desulfitobacterium sp.* Strain Y51, *Journal of Bacteriology*, Vol. 184, No. 13. p. 3419-3425.

The tetrachloroethene (PCE) reductive dehalogenase (encoded by the *pceA* gene and designated PceA dehalogenase) of *Desulfitobacterium sp.* strain Y51 was purified and characterized. The expression of the enzyme was highly induced in the presence of PCE and trichloroethene (TCE). The purified enzyme catalyzed the reductive dehalogenation of PCE *via* TCE to cis-1,2-dichloroethene at a specific activity of 113.6 nmol · min<sup>-1</sup> · mg of protein<sup>-1</sup>. The apparent K<sub>m</sub> values for PCE and TCE were 105.7 and 535.3 μM, respectively. Chlorinated ethenes other than PCE and TCE were not dehalogenated. However, the enzyme exhibited dehalogenation activity for various chlorinated ethanes such as hexachloroethane, pentachloroethane, 1,1,1,2-tetrachloroethane, and 1,1,2,2-tetrachloroethane. The *pceA* gene of *Desulfitobacterium sp.* strain Y51 was identified in a 2.8-kb DNA fragment and used to

express the protein in *Escherichia coli* for the preparation of antibodies. Immunoblot analyses located PceA in the periplasm of the cell.

112- McDonald, I. R., N. V. Doronina, Y. A. Trotsenko, C. McAnulla, and J. C. Murrell. 2001. *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov., *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:119-122.

113- M.H.A. van Eekert et G. Schraa, 2001, The potential of anaerobic bacteria to degrade chlorinated compounds, *Water Science & Technology* Vol 44 No 8 pp 49–56.

Chlorinated ethenes and chlorinated aromatics are often found as pollutants in sediments, groundwater, and wastewater. These compounds were long considered to be recalcitrant under anaerobic conditions. In the past years however, dechlorination of these compounds has been found to occur under anaerobic conditions at contaminated sites and in wastewater treatment systems. This dechlorination is mainly attributed to halo-respiring bacteria, which are able to couple this dechlorination to energy conservation *via* electron transport coupled phosphorylation. The dechlorinating activities of the halo-respiring bacteria seem to be confined to the dechlorination of chloroethenes and chlorinated aromatic compounds. In addition, methanogenic and acetogenic bacteria are also able to reduce the chlorinated ethenes *via* a-specific cometabolic pathways. Although these latter reactions may not be important in the remediation of contaminated sites, they may be of substantial influence in the start-up of remediation processes and in the application of granular sludge from UASB reactors. Specific halo-respiring bacteria may be used to increase the dechlorination activities *via* bioaugmentation in the case that the appropriate microorganisms are not present at the contaminated site or in the sludge.

114- Harper, D. B.: The global chloromethane cycle: biosynthesis, biodegradation and metabolic role, *Nat. Prod. Rep.*, 17, 1–12, 2000.

115- Thomas S. Cornuet, Aerobic and Anerobic Bioremediation of cis-1, 2-Dichloroethene and Vinyl Chloride, The 2nd International Conference on the Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds.

116- Best, J.H. de; Hage, A.; Doddema, H.J.; Janssen, D.B.; Harder, W., 1999, Complete transformation of 1,1,1-trichloroethane to chloroethane by a methanogenic mixed population, *Appl Microbiol Biotechnol* (1999) 51: 277±283.

117- Coulter, C., Hamilton, J. T. G., McRoberts, W. C., Kulakov, L., Larkin, M. J., Harper, D. B., 1999, Halomethane:Bisulfide/Halide Ion Methyltransferase, an Unusual Corrinoid Enzyme of Environmental Significance Isolated from an Aerobic Methylotroph Using Chloromethane as the Sole Carbon Source. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4301-4312.

118- Vannelli, T., Messmer, M., Studer, A., Vuilleumier, S. and Leisinger, T. (1999) A Corrinoid-Dependent Catabolic Pathway for Growth of a *Methylobacterium* Strain with Chloromethane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:4615-4620.

119- Wiedemeier T.H., Newell C.J., Rifai H.S. et Wilson J.T., 1999. Natural Attenuation of Fuels and Chlorinated Solvents in the Subsurface. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

120- Yagi, O., Hashimoto, A. , Iwasaki, K. and Nakajima, M. (1999) Aerobic degradation of 1, 1, 1-trichloroethane by *Mycobacterium spp.* isolated from soil *Applied and Environmental Microbiology* (1999), 4693-4696.

Two strains of 1,1,1-trichloroethane (TCA)-degrading bacteria, TA5 and TA27, were isolated from soil and identified as *Mycobacterium spp.* Strains TA5 and TA27 could degrade 25 and 75 mg · liter of TCA cometabolically in the presence of ethane as a carbon source, respectively. The compound 2,2,2-trichloroethanol was produced as a metabolite of the degradation process.

121- Van Eekert, M. H. A., Schroder, T. J., Stams, A. J. M., Schraa, G. & Field, J. A. (1998). Degradation and fate of carbon tetrachloride in unadapted methanogenic granular sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7), 2350-2356.

122- Vannelli, T., Studer, A., Kertesz, M. and Leisinger, T. (1998) Chloromethane Metabolism by *Methylobacterium sp.* Strain CM4. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1933-6.

123- Best, J.H. de; Jongema, H.; Weijling, A.; Doddema, H.J.; Janssen, D.B.; Harder, W. (1997), Transformation of 1,1,1-trichloroethane in an anaerobic packed-bed reactor at various concentrations of 1,1,1-trichloroethane, acetate and sulfate

Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane (CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub>) was observed in an anaerobic packed-bed reactor under conditions of both sulfate reduction and methanogenesis. Acetate (1 mM) served as an electron donor. CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> was completely converted up to the highest investigated concentration of 10 μM. 1,1-Dichloroethane and chloroethane were found to be the main transformation products. A fraction of the CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> was completely dechlorinated *via* an unknown pathway. The rate of transformation and the transformation products formed depended on the concentrations of CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub>, acetate and sulfate. With an increase in sulfate and CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> concentrations and a decrease in acetate concentration, the degree of CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> dechlorination decreased. Both packed-bed reactor studies and batch experiments with bromoethanesulfonic acid, an inhibitor of methanogenesis, demonstrated the involvement of methanogens in CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub> transformation. Batch experiments with molybdate showed that sulfate-reducing bacteria in the packed-bed reactor were also able to transform CH<sub>3</sub>CCl<sub>3</sub>. However, packed-bed reactor experiments indicated that sulfate reducers only had a minor contribution to the overall transformation in the packed-bed reactor.

124- Loffler, F.E., Champine, J.E., Ritalahti, K.M., Sprague, S.J., Tiedje, J.M., 1997. Complete reductive dechlorination of 1,2-Dichloropropane by anaerobic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (7), 2870– 2875.

125- S Hartmans et J A De Bont, 1992, Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L1., *Appl Environ Microbiol.* 58(4): 1220-1226.

*Mycobacterium aurum* L1, capable of growth on vinyl chloride as a sole carbon and energy source, was previously isolated from soil contaminated with vinyl chloride (S. Hartmans *et al.*, *Biotechnol. Lett.* 7:383-388, 1985). The initial step in vinyl chloride metabolism in strain L1 is catalyzed by alkene monooxygenase, transforming vinyl chloride into the reactive epoxide chlorooxirane. The enzyme responsible for chlorooxirane degradation appeared to be very unstable and thus hampered the characterization of the second step in vinyl chloride metabolism. Dichloroethenes are also oxidized by vinyl chloride-grown cells of strain L1, but they are not utilized as growth substrates. Three additional bacterial strains which utilize vinyl chloride as a sole carbon and energy source were isolated from environments with no known vinyl chloride contamination. The three new isolates were similar to strain L1 and were also identified as *Mycobacterium aurum*.

126- J W Davis and C L Carpenter, 1990, Aerobic biodegradation of vinyl chloride in groundwater samples, *Appl Environ Microbiol.* 56(12): 3878–3880.

127- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1989. Toxicological Profile for 1,1,2-Trichloroethane. Prepared by Syracuse Research Corporation, under Subcontract to Clement Associates, Inc., Contract No. 205-88-0608. U.S. Public Health Service, ATSDR/TP-89/24.

128- Galli R, McCarty PL., 1989, Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium sp.* *Appl Environ Microbiol.* 55(4):837-44.

A gram-positive, strictly anaerobic, motile, endospore-forming rod, tentatively identified as a proteolytic *Clostridium sp.*, was isolated from the effluent of an anaerobic suspended-growth bioreactor. The organism was able to biotransform 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane. 1,1,1-Trichloroethane was completely transformed (greater than or equal to 99.5%) by reductive dehalogenation to 1,1-dichloroethane (30 to 40%) and, presumably by other mechanisms, to acetic acid (7%) and unidentified products. The reductive dehalogenation of tetrachloromethane led to the intermediate trichloromethane, which was further transformed to dichloromethane (8%) and unidentified products. The biotransformation occurred during the

exponential growth phase, as well as during the stationary phase. Tetrachlorethene, trichloroethene, 1,1-dichloroethene, chloroethane, 1,1-dichloroethane, and dichloromethane were not biotransformed significantly by the organism.

129- Oldenhuis R, Vink RL, Janssen DB, Witholt B., 1989, Degradation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. Appl Environ Microbiol. 55(11): 2819-26.

Degradation of trichloroethylene (TCE) by the methanotrophic bacterium *Methylosinus trichosporium* OB3b was studied by using cells grown in continuous culture. TCE degradation was a strictly cometabolic process, requiring the presence of a cosubstrate, preferably formate, and oxygen. *M. trichosporium* OB3b cells degraded TCE only when grown under copper limitation and when the soluble methane monooxygenase was derepressed. During TCE degradation, nearly total dechlorination occurred, as indicated by the production of inorganic chloride, and only traces of 2,2,2-trichloroethanol and trichloroacetaldehyde were produced. TCE degradation proceeded according to first-order kinetics from 0.1 to 0.0002 mM TCE with a rate constant of 2.14 ml min<sup>-1</sup> mg of cells<sup>-1</sup>. TCE concentrations above 0.2 mM inhibited degradation in cell suspensions of 0.42 mg of cells ml<sup>-1</sup>. Other chlorinated aliphatics were also degraded by *M. trichosporium* OB3b. Dichloromethane, chloroform, 1,1-dichloroethane, and 1,2-dichloroethane were completely degraded, with the release of stoichiometric amounts of chloride. trans-1,2-Dichloroethylene, cis-1,2-dichloroethylene, and 1,2-dichloropropane were completely converted, but not all the chloride was released because of the formation of chlorinated intermediates, e.g., trans-2,3-dichlorooxirane, cis-2,3-dichlorooxirane, and 2,3-dichloropropanol, respectively. 1,1,1-Trichloroethane, 1,1-dichloroethylene, and 1,3-dichloropropylene were incompletely converted, and the first compound yielded 2,2,2-trichloroethanol as a chlorinated intermediate. The two perchlorinated compounds tested, carbon tetrachloride and tetrachloroethylene, were not converted.

130- Hartmans S, Schmuckle A, Cook AM, *et al.* 1986. Methyl chloride: Naturally occurring toxicant and C-I growth substrate. J Gen Microbiol 132:1139-142.

# **IX. RETOURS DE TERRAIN ET EVALUATION DES BIOTRAITEMENTS**

## 1. Rôle des biotests dans le suivi sur site

La restauration chimique et biologique de sites et sols contaminés est l'objectif principal des techniques de bioremédiation. Le succès d'application de ces techniques sur site est fréquemment mesuré par analyse chimique des matrices après une période donnée d'activité microbienne et, en déterminant à partir de quel niveau certaines molécules diminuent jusqu'à atteindre un niveau « admissible » pour l'homme et son environnement.

Le recours à des tests biologiques permet une comparaison de la toxicité avant et après traitement, ce qui va valider l'application du traitement sur le terrain. De plus, la diversité des essais permet une hétérogénéité des effets testés (aigu, chronique, génotoxique) ainsi que des organismes utilisés (producteur, consommateur, décomposeur), ce qui aboutit à une évaluation complète des effets du biotraitement sur l'écosystème et non seulement en terme chimique.

## 2. Exemples choisis

Dans l'étude de l'atténuation naturelle et des procédés de biotraitement des sols, il est intéressant de comparer la toxicité des sites testés avant et après bioremédiation. En effet, le principal objectif de la remédiation des sols pollués est de détruire les contaminants chroniques, en particulier les agents cancérigènes. Cependant, les essais utilisés comme, par exemple, les tests de génotoxicités sont la plupart du temps développés avec des extraits aqueux ou des suspensions aqueuses de sols, mais les HAP carcinogènes ont une solubilité basse dans l'eau, ce qui rend difficile les tests. Néanmoins, des auteurs ont pallié ces problèmes en ajustant les tests aux matrices testées. Les exemples suivants montrent différentes approches pour évaluer la qualité de sites contaminés avant et après bioremédiation.

### Etude 1 : utilisation de tests de génotoxicité en phase solide

Alexander *et al.* (2002) ont étudié la génotoxicité de sols contaminés (ancienne usine à gaz) par des HAP dont certains étant des cancérigènes reconnus (B(a)P ; B(a)A ; B(k)F ; B(b)F ; IP ; diB(ah)A). Les tests de génotoxicité appliqués sont des essais en phase solide dans lesquels les organismes tests ont un contact prolongé avec la matrice à tester. Ce sont des essais de mutagénèse de 48h sur une souche modifiée de *Pseudomonas putida*. Les analyses ont été réalisées avant et après bioremédiation sur une période de 147 jours (les informations concernant la bioremédiation ne sont pas fournies dans la publication).

Durée (jours)	mg/kg (en poids frais)						Mutants Induits (nb/g)
	B(a)A	B(k)F	B(b)F	B(a)P	IP	DiB(ah)A	
0 (avant traitement)	80*	38.1	40.1	95.4	24.6	8.6	1000
58	54.2	35.4	32.7	51	23.8	8	1565
101	56.1	38.5	33.3	51	24.8	8.5	730
147	42.1	32.2	30.3	46.4	22.1	7.4	215

\* moyenne de triplicats

**Tableau 26.** Concentrations en HAP et mutagénicité d'échantillons de sols contaminés (ancienne usine à gaz) avant et après bioremédiation (d'après Alexander *et al.*, 2002)

Approximativement, la moitié du contenu en B(a)A et B(a)P a disparu après 147 jours de traitement. La dégradation du B(b)F est faible durant cette période (25%), pour les 3 autres HAP testés, aucune modification n'est notée après 147 jours. Le nombre de mutants est augmenté significativement après 58 jours par rapport au début de l'expérience.

Après 147 jours, une diminution significative de la mutagénicité est observée (80%). **La baisse de génotoxicité observée est un résultat probable du métabolisme microbien des HAP et de la présence d'autres molécules dans les sols et interagissant avec les HAP (séquestration).**

**Rappels des caractéristiques de l'étude 1 :**

Matrice étudiée : Sols d'anciennes usines à gaz

Polluants : HAP

Durée : 147 jours

Suivi : essais de mutagénèse avec *Pseudomonas putida* avant et après biotraitement

Micro-organismes du sol : non indiqué

[6 HAP]<sub>cancérogènes</sub> avant traitement = 286,8 mg/kg poids frais

[6 HAP]<sub>cancérogènes</sub> après traitement = 180,5 mg/kg poids frais

Etude 2 : étude de la phytotoxicité

Le monitoring de la bioremediation de sols contaminés au moyen de bioessais met en avant les changements des contenus en molécules toxiques présentes dans les sols et biodisponibles tout au long du procédé de biodégradation. Hawrot et Nowak (2005) se sont intéressés aux pollutions par des carburants de type diesel de sols en Pologne. Le suivi sur terrain de la qualité du sol a été réalisé au moyen d'un test plante (orge de printemps)<sup>10</sup>, les données sur site contaminé sont comparées à des données sur site témoin. Un mélange de 3 cultures bactériennes est utilisé pour l'inoculation du sol (1 *Pseudomonas sp.*, 2 *Bacillus sp.*). Le sol (pH 6,7 ; 0,09% azote total et 1% carbone total) a été pollué avec 5% diesel, diverses parcelles ont été testées (témoin ; 0=sol pollué seulement ; I=sol pollué + fertilisant + retournement ; II=sol pollué + fertilisant + retournement + inoculation). Les résultats obtenus montrent que la quantité initiale de diesel affectent la germination des graines d'orge et la croissance de la plante et des racines. Après 150 jours, 100% des graines ont germé dans la parcelle II, 80% dans la parcelle I et 46% dans la parcelle 0. Le contenu en fuel diesel dans le sol a été modifié (teneurs non précisées dans la publication). Le calcul de l'index de résistance (cf note 8) montre des valeurs plus grandes dans la parcelle II comparée aux autres (0 et I) avec IR=0,91 après 150 jours pour II alors qu'à t=0, RI = 0. **Ceci permet d'affirmer la décomposition du polluant et donc la diminution de sa toxicité pour l'orge.**

**Rappels des caractéristiques de l'étude 2 :**

Matrice étudiée : Sols contaminés en Pologne

Polluants : carburants de type diesel

Durée : 150 jours

Suivi : tests plante sur orge de printemps en comparaison avec site témoin

Micro-organismes du sol : 1 *Pseudomonas sp.*, 2 *Bacillus sp.*

[diesel] site contaminé à T0 = 5 %

[diesel] site contaminé après 150 jours = non précisé

Etude 3 : Diversité floristique et faunistique et phytotoxicité

En 1992 (Duncan *et al.*, 2003), une étude a débuté aux EU (Tulsa, Oklahoma) pour comparer les effets de l'atténuation naturelle dans la restauration de sols contaminés par du pétrole brut.

<sup>10</sup> Test d'inhibition de germination et de croissance : expérimentation sur 10 jours, avec relevé des graines germées tous les 2 jours et mesure de la longueur de la plantule et des racines à la fin du test pour calculer l'index de résistance = Longueur racinaire dans le sol pollué / Longueur racinaire dans le témoin (Marecik *et al.*, 1999)

Trois lysimètres ont été placés sur le site et 79,5 litres (soit 17000 mg/kg) de pétrole brut ont été appliqués sur 2 des lysimètres en surface jusqu'à une profondeur de 30 cm. L'application de fertilisant a été réalisée sur un des deux lysimètres contaminés (nommé OF) et l'humidité maintenue à 80%. Ni eau (excepté l'eau de pluie), ni fertilisant n'ont été ajoutés au lysimètre contaminé restant (nommé O) et au témoin. Après 190 jours, la concentration en hydrocarbures totaux décroît à 12580 mg/kg dans le lysimètre O et à 2040 mg/kg dans le lysimètre OF. De 1995 à 1997, une étude des effets à long terme de la pollution est initiée sur le site. Une analyse de la diversité floristique et faunistique (nématodes) et des tests de phytotoxicité (graines de soja) sont réalisés pour le suivi de la qualité du site. Les résultats montrent une diminution des hydrocarbures totaux de 1995 à 1997 dans le lysimètre avec fertilisant OF (teneurs faibles en surface et profondeur de l'ordre de 500 mg/kg).

La diversité bactérienne a été étudiée et 3 classes de bactéries ont été relevées dans les 3 lysimètres : des bactéries hétérotrophes aérobies, des bactéries dégradant le naphthalène et le phénanthrène, des bactéries du cycle de l'azote. Concernant les nématodes, les indices de diversité et maturité restent bas en 1997 pour les lysimètres O et OF comparé au témoin suggérant que la communauté continue 5 ans après la pollution d'être impactée par les toxiques pétroliers. Le test de germination et croissance sur soja indique que les conditions des lysimètres O et OF ne sont pas adaptées pour ces plantes. De plus, l'étude des espèces identifiées sur le site montre une divergence selon le lysimètre avec le plus grand nombre d'espèces pour le lysimètre OF (15 au total en 1997 alors que le témoin en compte 8).

Ces résultats montrent non seulement **une bioremédiation du site mais également une restauration de l'écosystème dès que les niveaux de polluants ont atteint des seuils bas (inférieurs à 500 mg/kg pour les hydrocarbures totaux)** : dans un premier temps la baisse des concentrations en composés toxiques permet le retour des micro-organismes sensibles et de la mésofaune, dans un second temps, la diminution des bactéries dégradant les hydrocarbures va modifier le pH du sol et les taux relatifs de décomposition aérobie/anaérobie.

#### **Rappels des caractéristiques de l'étude 3 :**

Matrice étudiée : Sols contaminés aux EU

Polluants : pétrole brut

Durée : 190 jours puis 2 ans

Suivi : diversités floristique et faunistique + phytotoxicité

Micro-organismes du sol : bactéries hétérotrophes aérobies, bactéries dégradant le naphthalène et le phénanthrène, bactéries du cycle de l'azote

[Hydrocarbures totaux] à T0 = 17000 mg/kg

[Hydrocarbures totaux] après 190 jours = 12580 mg/kg (sans fertilisant) et 2040 mg/kg (avec fertilisant)

#### Etude 4 : procédure d'évaluation du risque au moyen d'une batterie de tests (Exemple 1)

La communauté européenne a financé un projet concernant le *monitoring* écotoxique de 4 sites industriels pollués par des HAPs et l'évaluation de diverses techniques de remédiation (Programme ECOMOSART, 1997-1999, coordinateur : IRH Environnement) avec :

- F1 (+ chargé en HAP soit 4649 mg/kg MS) et F2 = ancienne cokerie à haut fourneau
- F3 et F4 = site industriel désaffecté
- GK1, GK2, GK3 (teneurs en HAP < Iq) = cokerie + anciens puits à charbon
- P1 (teneurs < Iq sauf pour 3 HAP 0,1 mg/kg), P2, P3 = usine à haut fourneau

Cinq types de traitements ont été testés :

1. ajout de fertilisant + bactéries dégradant les HAP (expérimentation en bioréacteur durant 11 semaines)
2. *landfarming* durant 5 mois dans une unité de traitement d'une serre (contenus en eau et oxygène ajustés)
3. atténuation naturelle durant 3 mois (essai en colonne avec ajustement humidité sol)
4. traitement thermique (450 °C sous 0,1 atm)
5. ajout de tensioactif (10% Berol) dans une unité de flottation.

Les traitements 3 et 4 ont été réalisés par IRH. Les effets toxiques des polluants présents ont été étudiés avant et après traitement directement ou au moyen de lixiviation. Une batterie composée de tests terrestres et aquatiques a été proposée<sup>11</sup>. En complément des bioessais classiques, l'étude de l'induction de cytochrome P<sub>450</sub>1A1 chez le rat exposé aux sols pollués et traités. Les résultats sont résumés dans le tableau 27. Les échantillons F1, F2 et P3 sont les plus toxiques conformément aux résultats obtenus.

		F1	F2	F3	F4	GK1	GK2	GK3	P1	P2	P3
		Ancienne cokerie		Site industriel désaffecté		Cokerie + anciens puits à charbon			Usine à haut fourneau		
Avant	Extraits sols	Toxicité									
		Génotoxicité									
	Sols bruts	Microtox solide									
		Biomarqueur									
Après	Extraits sols	Toxicité	Traitement 5								
		Génotoxicité	Traitements 4,5								Trait 4,5
	Sols bruts	Microtox solide	Trait 5					Trait 5			
		Biomarqueur	Traitements 3,5				Trait 3,5				Trait 3,5

En grisé, les réponses significativement toxiques

Remarque : pour les données après traitements, seules les réponses toxiques sont données et les traitements à l'origine de la réponse toxique sont précisés

**Tableau 27.** Toxicité et génotoxicité des échantillons de sols avant et après traitement

Tous les sols traités montrent une réduction des concentrations en HAP mais les traitements physico-chimiques (4 et 5) ne sont pas sélectifs et réduisent les HAP légers et lourds alors que les traitements biologiques (1,2 et 3) ne réduisent que les HAP légers. Les résultats des tests biologiques montrent :

- une réduction de la toxicité pour les essais en phase liquide excepté pour les sols F1 et F2 avec le traitement 5 (lié à la toxicité des résidus de tensio-actifs)
- la génotoxicité est réduite sauf pour les traitements physiques (4 et 5)
- une réduction de la toxicité avec les tests solides sauf pour le traitement 5.

Ainsi, la comparaison des résultats avant et après traitement permet d'évaluer les processus de remédiation en complément des analyses chimiques. Cependant, la génotoxicité trouvée après les traitements physiques peut provenir d'autres composés tels que les métaux lourds qui n'ont pas été mesurés spécifiquement comme les HAP (par exemple le passage du CrIII en CrVI peut être à l'origine de la génotoxicité).

<sup>11</sup> Test Microtox phase solide, test sur *Folsomia candida*, test d'inhibition de la nitrification pour les essais en phase solide ; Test Microtox, *Thamnocephalus platyurus*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna*, cellules de poisson, test Ames, Mutatox et Test Umu pour les essais en phase liquide

**Rappels des caractéristiques de l'étude 4 :**

Matrice étudiée : sites industriels (4 sites)

Polluants : HAP

Durée : 3 à 5 mois pour atténuation naturelle

Suivi : toxicités directe et indirecte au moyen d'une batterie de biotests

Micro-organismes du sol : bactéries dégradant les HAP

[HAP] à T0 = 4649 mg/kg MS pour site F1 (+ chargé), 1384 mg/kg MS pour site F2

[HAP] après 3 mois = 2243 mg/kg (F1) et 951 mg/kg (F2), atténuation naturelle

[HAP] = 0,9 mg/kg (F1) et 6 mg/kg (F2), traitement thermique

Etude 5 : procédure d'évaluation du risque au moyen d'une batterie de tests (Exemple 2)

Le CNRSP s'est intéressé au traitement biologique d'un sol industriel localisé dans le Nord de la France.

L'étude visait à évaluer l'efficacité du traitement des sols pollués (biotraitement par andains) par des HAP sur la base de l'évolution des caractéristiques physico-chimiques et écotoxiques (Lors *et al.*, 2005 ; 2006). Les terres ont été prélevées au démarrage (sol Ti) et après 6 mois de biotraitement (sol Tf). Les résultats des analyses sont présentés dans le tableau 28.

Sol	HAP totaux (mg/kg PS)	Tests sur phase solide (%CE 50)		Tests sur lixiviats (aigu) (%CE 50)	
		Plante	Vers	Microtox	Daphnie
Ti	2894 0,65 (lixiviables à l'eau)	29,2 (germination) 16,7 (croissance)	0,6 (mortalité)	8,1	62
Tf (après 6 mois)	801 (en majorité 5-6 cycles) 0,1 (lixiviables à l'eau)	NT	NT	>100	NT

**Tableau 28.** Résultats des analyses chimiques et écotoxiques avant et après traitement

Les résultats montrent une réduction importante de la teneur en HAP totaux et lixiviables après 6 mois de traitement (72 % et 85% respectivement). La réduction concerne majoritairement les HAP à 2 et 3 cycles (92 et 89 %) et ceux à 4 cycles (48%). La disparition des HAP résulte en partie de la présence dans le sol initial d'une microflore indigène ( $10^5$  à  $10^7$  bactéries/g de sol).

La réduction des HAP s'est accompagnée d'une chute de la toxicité : les terres présentaient avant traitement une forte écotoxicité terrestre (laitue et vers) et aquatique (Microtox et daphnie), après 6 mois de biotraitement, la toxicité a disparu.

**Le fait que l'écotoxicité aiguë diminue dans les mêmes proportions que les HAP légers laisse présager que l'écotoxicité aiguë pourrait être associée à ce type de HAP.**

Concernant la génotoxicité, des tests sur cellules de lymphomes de souris ont montré la présence d'éléments génotoxiques avant traitement mais, après 6 mois, aucune génotoxicité n'a été exprimée et ce malgré la présence d'HAP lourds comme le B(a)P. **Ceci laisse penser que ces HAP à 5-6 cycles ne sont pas biodisponibles, probablement transportés sous forme particulaire, fixés sur la matière en suspension et/ou les colloïdes.**

**Rappels des caractéristiques de l'étude 5 :**

Matrice étudiée : sol industrialisé Nord France

Polluants : HAP

Durée : 6 mois (biotraitement par andains)

Suivi : toxicités directe et indirecte au moyen d'une batterie de biotests

Micro-organismes du sol : bactéries dégradant les HAP

[HAP totaux] = 2894 mg/kg MS + toxicités directe et indirecte

[HAP] après 6 mois = 801 mg/kg MS + non toxique

**Etude 6 : suivi écotoxique de la dégradation des HAP dans des sols d'anciennes cokeries**

Les objectifs de la recherche concernaient l'évaluation du devenir des polluants organiques et de leurs impacts écotoxiques au cours de leur atténuation naturelle dans deux anciens sites (sites 1 et 2) de cokerie (Jauzein *et al.*, 2000). Les caractérisations chimiques et biologiques ont montré que ces deux sols présentaient un pH proche de 8, une humidité de l'ordre de 20 %, une forte teneur en HAP ([16 HAP] > 1000 mg/kg) et une bonne activité biologique ( $10^8$  à  $10^9$  bactéries et  $10^5$  champignons / g sol sec). Le sol 1 contenait une teneur globale plus élevée que le sol 2 ([16 HAP] = 2,15 g/kg).

Dans les deux sols, le fluoranthène constitue le polluant majoritaire. De plus, le sol 1 se caractérisait par une très forte pollution en zinc (1370 mg/kg) et plomb (545 mg/kg). La biodégradation a été estimée par le suivi de la disparition des HAP dans les sols. La toxicité a également été suivie au moyen du test Microtox®. Les résultats des analyses sont présentés dans le tableau 29.

Temps	Sol 1	Sol 2	
T0	2150	1300	HAP totaux mg/kg PS
	830	600	HAP 3 cycles mg/kg PS
	900	350	HAP 4 cycles mg/kg PS
	556	2083	Microtox (UT = 100/CE50)
Après 8 mois	1300	650	HAP totaux mg/kg PS
	250	200	HAP 3 cycles mg/kg PS
	700	260	HAP 4 cycles mg/kg PS
	250	1000 ap 98 jours puis 1630	Microtox (UT = 100/CE50)

Tableau 29. **Résultats des analyses chimiques et écotoxiques à T0 et après 8 mois**

**Les résultats montrent la biodégradation des HAP après 8 mois en particulier les HAP à 3 cycles.** Les HAP à 4 cycles contribuent également à cette évolution mais de manière moins amplifiée. Pour ces deux sols, une réduction de la teneur globale en HAP a été observée de l'ordre de 40 à 50 %. La biodégradation entraîne également une diminution de la toxicité des sols, de 58 et 22 % respectivement pour les sols 1 et 2. Pour le sol 2, les phénomènes sont particuliers puisque à partir de 98 jours, sa toxicité augmente à nouveau. Ceci est probablement dû à la fois à l'apparition de composés toxiques issus de la dégradation des HAP et à des conditions particulières caractérisant ce site.

**Globalement, la biodégradation a permis de diminuer la toxicité des sols étudiés. Toutefois, ils représentent encore un danger potentiel pour l'environnement en fin d'expérimentation.**

**Rappels des caractéristiques de l'étude 6 :**

Matrice étudiée : anciennes cokeries (2 échantillons)

Polluants : HAP + métaux

Durée : 8 mois pour atténuation naturelle

Suivi : toxicité indirecte au moyen du Microtox

Micro-organismes du sol : bactéries dégradant les HAP

[HAP] à T0 = 2150 mg/kg MS pour sol 1 (HAP 3 cycles  $\approx$  HAP 4 cycles), 1300 mg/kg MS pour sol 2 (HAP 3 cycles > HAP 4 cycles)

Toxicité à T0 = sol 1 < sol 2

[HAP] après 8 mois = 1300 mg/kg MS pour sol 1 (HAP 3 cycles < HAP 4 cycles), 650 mg/kg MS pour sol 2 (HAP 3 cycles  $\approx$  HAP 4 cycles)

Toxicité ap 8 mois = sol 1 < sol 2

***Dans la majorité des cas traités, les résultats relatifs au comportement des polluants et ceux relatifs au traitement restent intimement liés. Il apparaît que les tests d'écotoxicité appliqués évaluent l'efficacité de traitement utilisé. Les analyses chimiques seules ne permettent pas de juger de l'efficacité des procédés de bioremédiation. L'application des essais biologiques permet d'appréhender l'évolution à plus ou long terme des matériaux traités. Dans ce sens une meilleure connaissance des effets des produits de transformation peut être conçue par le développement d'études d'écotoxicité pour chaque cas de terrain.***

### **3. Références bibliographiques sur les bioprocédés**

**NB les références indiquées sont celles citées dans le document et ne représente qu'une partie de la bibliographie réunie pour l'étude**

129- Lors C., Périé F., Grand C., Laboudigue A., 2006. Apport des tests d'écotoxicité dans l'évaluation de l'efficacité d'un traitement biologique de sols contaminés par des HAP. Colloque « Biodépollution et Environnement : Savoir et Savoir-faire », Paris (France). (poster)

130- Kathleen Duncan; Eleanor Jennings; Paul Buck; Harrington Wells; Ravindra Kolhatkar; Kerry Sublette; William T. Potter; Timothy Todd; 2003, Multi-Species Ecotoxicity Assessment of Petroleum-Contaminated Soil, *Soil and Sediment Contamination (formerly Journal of Soil Contamination)*, Volume 12, Number 2, pp. 181-206(26).

131- Hawrot Małgorzata, Nowak Andrzej, 2005, Monitoring of bioremediation of soil polluted with diesel fuel applying bioassays, *Electronic journal of Polish agricultural*, Vol 8, Issue 2.

132- Lors C., Périé F., Oustrière P., 2005. Physicochemical and biological monitoring of a biological treatment of PAHs polluted soil. 3rd European Bioremediation Conference, Chania (Crête). (communication orale)

133- Renee R. Alexander, Jixin Tang, and Martin Alexander, 2002, Genotoxicity is Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Undergoing Biological Treatment, *J Environ Qual* 31: 150-154.

134- IRH Environnement, 1997-1999, Programme ECOMOSART, *Ecotoxicological Monitoring of industrially polluted soils and assessment of the respective remediation techniques*, Communauté Européenne.

135- Jauzein M IRH Environnement (coordinateur), 2000, Mise en évidence de l'atténuation naturelle ou accélérée par des processus biologiques des HAP dans le sous-sol d'anciennes cokeries, contrat 98-156 de 24 mois.

# **X. CINETIQUES DE DEGRADATION**

## 1. Généralités

La biodégradation des composés organiques, leurs voies et les cinétiques des étapes de dégradation enzymatique, ont été généralement déterminées dans des conditions optimales de laboratoire telles que des systèmes aqueux ou des expérimentations en vase clos utilisant des suspensions sédiment/eau-sol ou des expérimentations en batch. Ces données, ont été utilisées principalement dans des modèles statistiques, mais ils sont difficilement applicables à des niveaux de biodégradation *in situ*.

Ainsi, les périodes de  $\frac{1}{2}$  vie comme paramètre et les cinétiques de 1<sup>er</sup> ordre comme fonction sont le plus souvent utilisées pour décrire la dégradation des contaminants en subsurface. Les modèles cinétiques de dégradation microbienne sont basés sur la concentration en substrat et la biomasse (Simkins et Alexander, 1984).

Ceci aboutit à plusieurs types de cinétique de dégradation dans les environnements naturels, souvent basés sur une approche empirique, et reflétant les niveaux rudimentaires des populations microbiennes et de leurs activités dans ces écosystèmes.

- 1) Quand le substrat est totalement disponible (sa biodisponibilité n'est pas un facteur limitant), la dégradation dépend seulement de l'activité des micro-organismes suivant une croissance logarithmique.
- 2) La seconde approche, dans laquelle la cinétique de 1<sup>er</sup> ordre est liée à la densité populationnelle, est la plus réaliste. Cette approche est décrite par l'équation (a) et la figure 15.

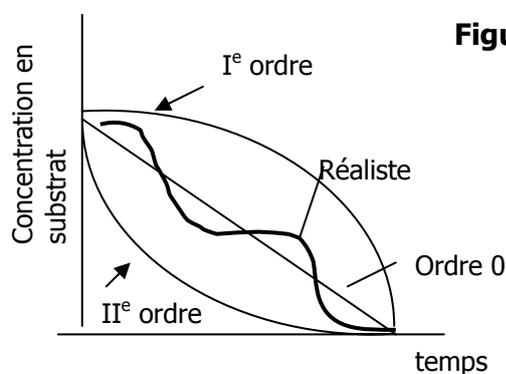
$$-\frac{dC}{dt} = kC^n \quad (a)$$

C = concentration en substrat

t = temps

k = constante de disparition du composé

n = un paramètre approprié



**Figure 15.** Ordres cinétiques de dégradation microbienne  
(d'après Suthersan, 1999)

La réponse des communautés microbiennes envers les composés organiques ne dépend pas de la concentration totale mais, plutôt de la concentration soluble dans l'eau. La biodisponibilité d'un composé relève d'une extrême importance car elle peut justifier la persistance de composés qui sont généralement biodégradables.

## 2. Les alcanes

La principale difficulté dans la dégradation microbienne des hydrocarbures est liée à la solubilité modérée des chaînes courtes des alcanes (Ionata *et al.*, 2005).

Comme les micro-organismes nécessitent une activité aqueuse relativement importante, les réactions d'oxydation se déroulent dans le biofilm aqueux entourant le milieu solide.

Un alcane à chaîne courte tel que le pentane (C<sub>5</sub>) peut être dégradé efficacement par *Arthrobacter sp.* dans des expérimentations en bioreacteur aérobie avec immobilisation des cellules microbiennes (utilisation d'un support en polymères pour fixer les cellules). Ainsi, les mesures sont effectuées à partir d'une solution synthétique contenant un supplément de 10% (v/v) de pentane (Ionata *et al.*, 2005). On observe une dégradation de 90% du pentane initial après 36h.

Une autre expérimentation aérobie réalisée par Koma *et al.* (2001) sur un alcane à chaîne longue montre une minéralisation complète du n-hexadécane (0,1% poids/volume dans un milieu minimum) par *Acinetobacter sp.* après 96h. Deux métabolites sont identifiés par GC/MS : le 1-hexadécanol (après 24h) et l'acide 1-hexadécanoïque qui sont également dégradés par la souche bactérienne.

D'autres auteurs (Bouchez-Naitali *et al.*, 2001) ont étudié les cinétiques de dégradation par voie aérobie (par respirométrie électrolytique à 30°C) de l'hexadécane (C<sub>16</sub>) chez quatre souches de *Rhodococcus equi*. Quelle que soit la souche, les cinétiques obtenues sont reproductibles et montrent une phase initiale courte de croissance exponentielle, suivie par une phase longue de croissance linéaire. Les taux de croissances spécifiques durant la phase exponentielle varient selon les souches de 0,11 à 0,20 h<sup>-1</sup> pour des concentrations initiales de 1000 à 61600 mg C<sub>16</sub>/l (phase aqueuse).

La cinétique de dégradation d'*Acinetobacter sp.* d'une alcane solide (n-heneicosane avec K<sub>s</sub> = 8,3 kg heneicosane/m<sup>3</sup> pristane) a été suivi par Choi *et al.* (1999) et les mesures ont été réalisées par CG. Pour des concentrations initiales de heneicosane de 0,25 à 1 kg/m<sup>3</sup>, le taux de croissance est de 0,60 h<sup>-1</sup> et le temps critique a été estimé à 8 heures. On observe une dégradation de 70% de l'alcane après 25h.

### **3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques**

Dans le cadre du projet "Promotion/limite de l'atténuation naturelle : cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques" (Christine Lors - Jean-Rémi Mossmann, CNRSSP<sup>12</sup>), une expérience de respirométrie a été réalisée en conditions de laboratoire (à 20°C et en aérobiose), sur un sol issu d'un ancien site de cokerie fortement pollué en HAP (de l'ordre de 1 g.kg<sup>-1</sup> pour les 16 HAP de la liste de l'EPA). Les cinétiques de dégradation ont montré que la disparition des HAP se répartit entre une phase abiotique, rapide, en début d'expérience, suivie d'une phase biotique, progressivement plus lente. Elle aboutit à une réduction significative de la concentration en HAP (46%) en 12 mois, qui concerne essentiellement les HAP à 3 (68%) et 4 (26%) cycles. Les HAP à 5 et 6 cycles sont peu voire non dégradés, même après 1 an d'incubation.

Des études de cinétiques de biodégradation en aérobiose d'un mélange d'HAP (phénanthrène, fluoranthène, pyrène, chrysène et B(a)P) dans des milieux aqueux (avec des concentrations finales de 5 mg/l pour chaque HAP) ont été réalisées avec un consortium bactérien (*Pasteurella sp.* et *Mycobacterium sp.* incubées à 22°C) isolé à partir de boues activées (Sepic *et al.*, 1997). Durant le premier mois d'incubation, les HAP à 3 et 4 cycles ont été dégradés : *Pasteurella* a métabolisé plus de 40 % du phénanthrène, fluoranthène et pyrène et *Mycobacterium*, plus de 75 %. Après 60 jours d'incubation, *Pasteurella* a atteint

<sup>12</sup> CNRSSP Infos du mois de décembre 2002 : [www.cnrssp.org/cnrsspinfo/Infos2002/Decembre2002.pdf](http://www.cnrssp.org/cnrsspinfo/Infos2002/Decembre2002.pdf) ;

LORS C. J.-R. MOSSMANN, C. SAHUT, 2002. Biodégradation des HAP dans un sol d'une ancienne cokerie. Evolution de la microflore dégradante au cours du processus de biodégradation, CD-ROM de la 1ère rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués

plus de 85 % de biodégradation. **Les HAP les plus lourds (Chrysène et B(a)P) se sont montrés récalcitrants dans les deux cas.**

Les études cinétiques ont montré **pour *Pasteurella sp.*** des corrélations linéaires de l'ordre de 0,9883 ; 0,9782 et 0,9684 pour le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène respectivement. Les constantes de vitesse calculées sont de -0,0127 ; -0,0273 et -0,0285 avec **des demi-vies correspondantes de 54,6 ; 25,4 et 24,3 jours pour le phénanthrène, le fluoranthène et au pyrène respectivement. Les cinétiques avec *Mycobacterium* aboutissent à des demi-vies de 19,1 ; 16,2 et 14,9 jours pour les mêmes composés respectivement.** Concernant les études métaboliques, les auteurs se sont intéressés aux métabolites du fluoranthène : deux métabolites ont été isolés par chromatographie à couches minces suivit d'une détection par spectrométrie de masse, l'acide 1-carboxylique 9-fluorenone ( $m/z = 224$ ) qui se dégrade en 9-fluorénone ( $m/z = 180$ ).

Des cinétiques de biodégradation du fluorène ( $C_{\text{initiale}} \approx 600 \mu\text{g/l}$ ) ont été réalisées au moyen d'essais en batch (à température ambiante soit 22°C) avec des cultures mixtes issues d'effluents contaminés par des hydrocarbures (Gomes *et al.*, 2006). **Les résultats montrent que tout le fluorène est dégradé après 8 heures d'incubation.** Les paramètres cinétiques  $k_{\text{max}}$  (constante de vitesse de dégradation maximale) et  $K_s$  (constante de demi-saturation) ont été calculés et donnent  $k_{\text{max}} = 3,20 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$  et  $K_s = 126 \mu\text{g/l}$ .

Aronson *et al.* (1999) ont résumé les paramètres cinétiques de dégradation des HAP en se référant à des études en laboratoire et sur le terrain. L'ensemble des données bibliographiques a permis d'aboutir à des valeurs moyennes des constantes de vitesse de dégradation. (tableau 30) :

Composé	Constante moyenne Jour <sup>-1</sup>	Encadrement Jour <sup>-1</sup>	Nombre de travaux repertoriés*
Naphtalène (minéralisation)	0,023	0-3,34	44
Naphtalène (dégradation primaire)	0,308	0-5	46
Fluorène (minéralisation)	0,019	0,0038-0,05	7
Fluorène (dégradation primaire)	0,015	0,0018-0,33	28
Benzo(a)Anthracène (minéralisation)	0,0029	0-0,116	32
Benzo(a)Anthracène (dégradation primaire)	0,0035	0,00009-0,072	27
Chrysène (minéralisation)	0,0037	0-0,035	20
Chrysène (dégradation primaire)	0,003	0-0,037	31
Fluoranthène (dégradation primaire)	0,0048	0-0,045	20
Pyrène (minéralisation)	0,006	0-0,143	18
Pyrène (dégradation primaire)	0,00345	0-0,052	40
Benzo(a)Pyrène (minéralisation)	0,00015	0-0,0037	25
Benzo(a)Pyrène (dégradation primaire)	0,0027	0-0,057	23

\* Nombre de travaux référencés par Aronson *et al.* (1999) pour le calcul des constantes moyennes

**Tableau 30.** Résumé des principales valeurs moyennes des constantes de vitesse de dégradation des HAP (d'après Aronson *et al.*, 1999)

Le calcul des constantes moyennes permet d'élaborer un classement des molécules les plus dégradables aux plus récalcitrantes (en tenant compte de taux trouvés pour les dégradations primaires) : naphthalène ( $0,308 \text{ j}^{-1}$ ) > fluorène ( $0,015 \text{ j}^{-1}$ ) > fluoranthène ( $0,0048 \text{ j}^{-1}$ ) > B(a)A, pyrène, chrysène ( $0,003 \text{ j}^{-1}$ ) > B(a)P ( $0,0027 \text{ j}^{-1}$ ). Cet ordre coïncide avec le fait que les composés les plus légers ont une vitesse de dégradation plus rapide que les composés lourds.

#### 4. Les solvants chlorés

Des valeurs de constantes de dégradation sont présentées dans le tableau 31 issu du rapport INERIS concernant les solvants chlorés (Denys, 2004). Ce tableau montre la large variation des valeurs de constante de dégradation, notamment entre les mesures effectuées en microcosmes et celles réalisées sur le terrain. Ces constantes étant des paramètres sensibles pour l'utilisation de modèles décrivant l'atténuation naturelle des solvants chlorés, il est important de les choisir de manière pertinente et éventuellement de recourir à une mesure spécifique pour le site étudié.

Composé	Biodégradation 1 <sup>er</sup> ordre Demi-vie (jours)	Microcosme	In situ
DCE	116		
	277-4331		
	495-1019		
1,2-DCE	2		
	77		
Chlorobenzène Cis-1,2 -DCE	117		
	27-82		
	77-976		X
	158-495		X
	289		X
	385-578		X
Trans-1,2-DCE	1386		X
	89-347		
	139		
CV	77		
	58 (aérobie)		
	23-100		
	82		X
	98-1690		X
TCA	533-1824		X
	693-806		X
	70	X	
	1,1,1-TCA	0,4	X
1,1-DCA	<1	X	
	198-210	X	
	<< 6 (en CA)	X	
	63-144	X	
	158	X	
1,2-DCA	100-365	X	

**Tableau 31.** Valeurs des constantes de demi-vies issues de la littérature (d'après Denys, 2004)

Des cinétiques d'utilisation du chlorure de vinyle (CV) par un inoculum contenant *Pseudomonas aeruginosa* ont été réalisées en batch en conditions aérobies (Verce *et al.*, 2000). Dans le réacteur, le CV est sous forme de gaz.

**Les concentrations initiales en CV (100 µM) sont suffisamment importantes pour permettre le calcul d'une vitesse maximale d'utilisation (cinétique d'ordre 0) mais suffisamment basses pour obtenir une croissance bactérienne significative.**

Ainsi, la vitesse d'utilisation maximale par *P. aeruginosa* du CV est de **0,41 µmol CV/mg de SST (Solides en Suspension Totaux)/jour**, le taux de croissance spécifique étant de **0,0048 jour<sup>-1</sup>** et le K<sub>s</sub> (coefficient de demi-saturation de Monod) de 0,26 µM.

Une étude réalisée à partir d'échantillons de divers sites contaminés par des solvants chlorés a montré la présence de micro-organismes autochtones (souches de *Mycobacterium* prédominantes) responsables de la biodégradation du chlorure de vinyle (CV) (Coleman *et al.*, 2002). La détermination des cinétiques de croissance a été réalisée en conditions contrôlées aérobies avec les souches isolées (expérimentation en flacon : 150 µmol CV/flacon, incubation à 20°C, inoculation dans 50 ml de milieu de culture). **Les vitesses de croissance spécifiques maximales en présence de CV des souches de *Mycobacterium* sont de l'ordre de 0,17 à 0,23 jour<sup>-1</sup>. Les taux de dégradation du CV sont de 9 à 16 nmol/min/mg de protéine.**

**En conditions anaérobies** (hydrogène = donneur d'e<sup>-</sup>), la vitesse d'utilisation du CV par *Dehalococcoides* a été déterminé à partir des cinétiques de Monod pour aboutir à **7,8.10<sup>-10</sup> µmol de Cl<sup>-</sup> (copie<sup>-1</sup> jour<sup>-1</sup>)**, indiquant **une vitesse de croissance maximale de 0,4 jour<sup>-1</sup>** (Cupples *et al.*, 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* (souche NB1) peut dégrader le chlorométhane en conditions aérobie et anaérobie (Freedman *et al.*, 2004). La cinétique de dégradation a été suivie dans des expérimentations en batch. **En anoxie, la vitesse max d'utilisation du CM par NB1 (k<sub>max</sub>) est 5,01 µmol/mg SST/jour, le taux de croissance max (µ<sub>max</sub>) est de 0,0506 jour<sup>-1</sup> et le K<sub>s</sub> égal à 0,067 µM. En présence d'oxygène, les valeurs pour k<sub>max</sub>, µ<sub>max</sub> et K<sub>s</sub> sont de 10,7 µmol/mg SST/jour, 0,145 jour<sup>-1</sup>, 0,93 µM respectivement**, indiquant que la souche NB1 dégrade plus rapidement le CM en conditions aérobies.

Des expérimentations en batch en aérobiose ont été réalisées pour suivre la **biotransformation du 1,1,1-TCA** par *Clostridium sp.* (Galli et McCarty, 1989). La déhalogénéation du TCA en 1,1-Dichloroéthane a été mesurés à 35°C (7,5<[TCA]<sub>initiale</sub><750 µM), et les données ont permis d'aboutir à des paramètres cinétiques (d'après les équations de Monod) : **le K<sub>s</sub> est de 31 µM et le k<sub>max</sub> est de 0,28 µmol /mg/jour.**

La dégradation microbienne des méthane et éthane chlorés a été étudiée dans le cadre d'expérimentations en batch et chemostat avec des cultures de micro-organismes mixtes dégradant le méthane. **Le capacité de transformation T<sub>c</sub> peut être représentée comme une constante définie par la quantité de composé dégradé divisée par la quantité de cellules inactivées** (Chang et Alvarez-Cohen, 1996).

Dans le tableau 32 sont reportées les constantes calculées par les auteurs à partir des données expérimentales après 4 heures d'exposition (pour chaque composé). Les valeurs T<sub>c</sub> ont été mesurées en utilisant 3 différentes concentrations pour chaque composé (50 à 200 µg pour les composés très toxiques, 300 à 600 µg pour les composés à toxicité modérée et 600 à 1000 µg pour les composés à toxicité faible) dans 3 tubes contenant 20 mM formate et 1-10 mg de cellules en absence de méthane. Toutes les réactions ont été réalisées en duplicats à 20°C. **Il faut noter que les valeurs T<sub>c</sub> mesurées sont généralement inversement proportionnelles au nombre d'atomes de chlore** (Ethane et DCA ont les valeurs les plus importantes).

Composé	Activité cellulaire après 4h d'exposition (%)*	T <sub>c</sub> (µmol/mg cellules)	
		Culture en Chemostat	Culture en Batch
Chlorométhane	93	1,6	1,4
1,1,1,2-TeCA	25	0,07	Non dégradé
1,1,2,2-TeCA	3	0,09	Non dégradé
1,1,1-TCA	3	0,31	0,09
1,2-DCA	41	15	12
Ethane	108	30	33
Chlorure de vinyle	5	5,8	6,1

\* Cellules exposées aux composés individuels en absence d'autres substrats

**Tableau 32.** Valeurs T<sub>c</sub> mesurées pour chaque composé par des cultures mixtes après 4 h d'exposition (d'après Chang et Alvarez-Cohen, 1996)

**L'ensemble des données bibliographiques rapportées indique l'importance d'identifier les propriétés et compositions des composés potentiellement dégradables dans un mélange de contaminants afin de mieux appréhender les comportements des substances chimiques dans l'environnement. Les informations relatives aux cinétiques de dégradation permettent de donner des indications concernant la durée nécessaire à la dégradation des composés en question et donc à la nécessité de mettre en place des traitements sur le terrain plus poussés que les phénomènes de dégradation naturels (ou atténuation naturelle).**

## 5. Références bibliographiques sur les cinétiques de dégradation

**NB les références indiquées sont celles citées dans le document et ne représente qu'une partie de la bibliographie réunie pour l'étude**

136- Gomes R.C.B., Nogueira R., Oliveira J.M., Peixoto J. et Brito A.G., 2006, Kinetics of Fluorene Biodegradation by a Mixed Culture, *Biotechnology, Bioremediation, and Biomass, Advanced Technology in the Environmental Field*, 501-097

137- Ionata Elena, De Blasio Paola, La Cara Francesco, 2005, Microbiological degradation of pentane by immobilized cells of *Arthrobacter sp.*, *Biodegradation*, vol. 16, no1, pp. 1-9.

138- Denys S, 2004, Biodégradation des solvants chlorés en conditions naturelles mécanismes et caractérisation : Synthèse bibliographique, Rapport de synthèse pour le MEDD, 33 pages.

139- Freedman David L., Swamy Meghna, Bell Nathan C. et Verce Mathew F., 2004, Biodegradation of Chloromethane by *Pseudomonas aeruginosa* Strain NB1 under Nitrate-Reducing and Aerobic Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 8, p. 4629-4634

140- Cupples Alison M., Spormann Alfred M. et McCarty Perry L., 2003, Growth of a *Dehalococcoides*-Like Microorganism on Vinyl Chloride and cis-Dichloroethene as Electron Acceptors as Determined by Competitive PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 2, p. 953-959

141- Coleman N. V., Mattes T. E., Gossett J. M., Spain J. C., 2002, Phylogenetic and Kinetic Diversity of Aerobic Vinyl Chloride-Assimilating Bacteria from Contaminated Sites, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 6162-6171

142- Bouchez-Naitali M., Blanchet D., Bardin V., Vandecasteele J.-P., 2001, Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology* 147: 2537-2543

143- Koma D., Hasumi F., Yamamoto E., Ohta T., Chung S.-Y., Kubo M., 2001, Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter sp.*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Volume 91, Number 1, pp. 94-96

144- Verce M. F., Ulrich R. L. et Freedman D. L., 2000, Characterization of an isolate that uses vinyl chloride as a growth substrate under aerobic conditions, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:3535-3542.

145- Aronson D., Citra M., Shuler K., Printup H. et Howard PH., 1999, Aerobic Biodegradation of Organic Chemicals in Environmental Media: A Summary of Field and Laboratory Studies. Prepared for: U.S. Environmental Protection Agency, Athens, GA.

146- Choi D.H., Hori K., Tanji Y., Unno H., 1999, *Biochemical Engineering Journal*, 3: 71-78.

147- Suthersan SS, 1999, In situ bioremediation. Remediation engineering: design concepts. CRC Press LLC, Boca Raton.

148- Chang HL et Alvarez-Cohen L, 1996, Biodegradation of individual and multiple chlorinated aliphatic hydrocarbons by methane-oxidizing cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol 62, No. 9, 3371-3377

149- Galli R et McCarty PL, 1989, Biotransformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane, and tetrachloromethane by a *Clostridium sp.*, *Appl Environ Microbiol.*, 55(4):837-44.

150- Simkins S. M. et Alexander M., 1984, Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density, *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1299.

# **XI. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Ce projet visait à documenter l'importance des processus impliqués dans le traitement des sites et sols pollués en ciblant plus spécifiquement :

- les facteurs influençant la biodégradation ;
- les métabolites issus de ces voies de dégradation.

La réalisation de la recherche bibliographique s'est effectuée sans privilégier les retours de travaux de terrain par rapport aux exemples tirés de l'expérimentation en laboratoire, et elle s'est appuyée sur diverses bases de données. Une liste de mots clés a donc été définie et la bibliographie a été complétée durant l'ensemble de la période de l'étude.

*Un comité de pilotage a suivi le déroulement de l'étude et a permis la structuration du présent rapport dans le cadre de diverses réunions intermédiaires.*

**La première étape de dégradation aérobie des alcanes est catalysée par des oxygénases et aboutit à la formation de composés peu toxiques.**

**Peu d'espèces sont capables d'utiliser les cycloalcanes** comme source seule de carbone ; la façon la plus commune consiste en un cométabolisme par des cultures mixtes. Il en résulte une multitude de dérivés cétoniques.

**Le principe du métabolisme anaérobie des alcanes est encore peu connu.** L'attaque initiale n'inclut pas d'étape oxygène-dépendante, mais suppose un couplage à un métabolite cellulaire (toluène succinate par exemple).

**Les cas de terrain sont rarement documentés** et ils traitent le plus souvent d'un mélange de HAP et d'alcanes pour lesquels principalement est prise en compte la dégradation des HAP.

La plupart des travaux montrent un potentiel de dégradation existant pour les molécules à longue chaîne carbonnée et identifient les micro-organismes impliqués dans ces voies chimiques. **Les métabolites obtenus en laboratoire sont des composés d'acides gras, des acides et d'alcool ayant une toxicité moindre voire inexistante (non classé par l'IARC, DL50 orale > 1000 mg/Kg).**

Concernant la réactivité des métabolites avec les constituants du sol, aucune remarque ne peut être avancée, d'une part, **les métabolites sont pour la plupart intracellulaires** et d'autres part, du fait du manque de données sur les produits excrétés.

Les bactéries oxydent les **hydrocarbures aromatiques polycycliques** pour former des dihydrodiols de configuration cis. Cette réaction est **catalysée par la dioxygénase**. Diverses espèces bactériennes oxydent les HAP de faible PM. Les voies métaboliques des HAP lourds ressemblent à celles du naphthalène avec incorporation initiale d'une molécule de dioxygène par une dioxygénase suivie d'une dégradation en chaîne des cycles benzéniques.

**Deux étapes initiales ont été proposées dans le mécanisme de dégradation anaérobie** : la carboxylation et l'hydroxylation. Dans ce cas, le potentiel redox devient un facteur critique dans la détermination de la diversité métabolique des populations microbiennes dans les sols, sédiments et systèmes aquifères.

**Les études de terrain** rencontrées regroupe des essais de bio traitement aérobie sur sols pollués ou des retours d'observation d'atténuation naturelle après échantillonnage des terres polluées. **Divers paramètres spécifiques** des sols analysés influencent la biodégradation des HAP : pH, nutriments, O<sub>2</sub>, T°, % humidité, biodisponibilité des HAP, ancienneté de la contamination.

La destruction des HAP par des micro-organismes conduit à la formation de produits de dégradation. **Ces métabolites néoformés sont généralement plus solubles, et par conséquent plus mobiles, et présentent une toxicité différente de celle des HAP initiaux souvent plus faible** (*dans le cas des quinones, nous nous sommes intéressés qu'aux exemples relevés, cette remarque n'est donc pas à généraliser à l'ensemble des quinones*). Ces métabolites peuvent eux-même se dégrader et se minéraliser. Ils peuvent également s'accumuler dans les sols si leur cinétique de dégradation est plus lente que leur cinétique d'apparition.

**Le dioxyde de carbone et quelques quinones sont excrétés** par les micro-organismes lors du processus de dégradation. Le CO<sub>2</sub> gazeux se dissémine dans l'air et les quinones dont certaines interviennent comme facteurs de croissance des végétaux et peuvent interagir au niveau racinaire et être absorbées par certaines plantes.

Néanmoins, beaucoup des **métabolites identifiés sont intracellulaires** ou bien aucune indication n'est précisée, ce qui limite les remarques concernant les interactions possibles sol-métabolites.

Parmi **les solvants chlorés**, le **chlorométhane** peut être dégradé en conditions aérobie et anaérobie. **La voie aérobie semble la plus préoccupante** car elle induit la formation de formol comme intermédiaire métabolique.

**Le 1,1,1-TCA** peut être dégradé **par co-métabolisme** en conditions aérobie et anaérobie dans l'environnement. La biodégradation passe par une simplification moléculaire avec clivage des atomes chlorés. Ainsi, les principaux métabolites sont des acides et le dioxyde de carbone. **En conditions anoxiques, le 1,1,2-TCA est dégradé en un intermédiaire toxique : le chlorure de vinyle.**

Les travaux de House (2002) ont montré que **les métabolites majeurs issus de la biodégradation anaérobie des TeCA** dans des sols humides en microcosmes sont les **isomères de DCE, le chlorure de vinyle et l'éthène** (métabolite excréte).

**Certaines cultures microbiennes** peuvent décomposer **le chlorure de vinyle** par voies aérobie (par exemple *Mycobacterium sp.*) et anaérobie (*Clostridium sp.* et *Dehalococcoides sp.*) pour aboutir à du CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O.

**Les solvants ciblés lors de l'étude sont tous dégradables.** La destruction des molécules par des micro-organismes résulte d'une simplification par clivage des atomes de chlore, et conduit à la formation de produits de dégradation (métabolites) dont la structure chimique est moins complexe que la molécule parente.

**Parmi les métabolites excrétés**, le CO<sub>2</sub> gazeux se dissémine dans l'air et l'éthylène va interagir avec les végétaux. L'éthylène module de nombreux métabolismes (réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques), impliqué dans les étapes de floraison et stimulant la maturation de nombreux fruits. Néanmoins, beaucoup des métabolites identifiés sont intracellulaires ou bien aucune indication n'est précisée (par exemple, aucune précision n'est apportée sur le chlorure de vinyle et sa localisation lorsqu'il apparaît en milieu du chaînon métabolique), ce qui limite les remarques concernant les interactions possibles sol-métabolites.

**Concernant les bioprocédés**, les résultats relatifs au comportement des polluants et ceux relatifs au traitement restent intimement liés. Il apparaît que les tests d'écotoxicité appliqués évaluent l'efficacité de traitement utilisé. Les analyses chimiques seules ne permettent pas de juger de l'efficacité des procédés de bioremédiation. L'application des essais biologiques permet d'appréhender l'évolution à plus ou long terme des matériaux traités. Dans ce sens une meilleure connaissance des effets des produits de transformation peut être conçue par le développement d'études d'écotoxicité pour chaque cas de terrain.

L'ensemble des données bibliographiques rapportées indique l'importance d'identifier les propriétés et compositions des composés potentiellement dégradables dans un mélange de contaminants afin de mieux appréhender les comportements des substances chimiques dans l'environnement. Les informations relatives **aux cinétiques de dégradation** permettent de donner des indications concernant la durée nécessaire à la dégradation des composés en question et donc à la nécessité de mettre en place des traitements sur le terrain plus poussés que les phénomènes de dégradation naturels (ou atténuation naturelle).

**Une problématique de sols pollués représente toujours un cas unique. Il est donc important qu'une caractérisation précise (physique, chimique et microbiologique) des sols soit réalisée en amont de toute décision allant au-delà d'une simple mesure de polluants.**

Cet état de l'art concernant la biodégradation des composés organiques dans les sols a permis de dégager les principales voies de métabolisation des 3 familles sélectionnées à l'origine de l'étude. Néanmoins, le manque de données concernant certaines étapes fondamentales souligne la nécessité d'envisager des travaux complémentaires, notamment :

- La famille des alcanes est composée de diverses molécules à toxicité réduite, seul l'hexane représente un composé « à risque » pour l'environnement. Il serait nécessaire de préconiser des travaux expérimentaux sur le devenir de l'hexane dans les sols et sur les produits de dégradation sachant que sa métabolisation chez les mammifères produit un époxyde toxique.
- Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour conclure sur la voie anaérobie de dégradation des alcanes et sur les métabolites engendrés (localisation cellulaire par exemple).
- Les solvants chlorés représentent une famille de composés chimiques ubiquitaires au niveau industriel. De nombreux travaux sont disponibles mais peu précis sur les métabolites obtenus. La localisation des produits de dégradation est importante du fait de l'obtention de composés tels que le chlorure de vinyle dont la toxicité est connue. Une meilleure précision des modalités de dégradation dans l'environnement est à envisager afin de mieux cibler les conditions pouvant favoriser la production de métabolites toxiques.

## **XII. ANNEXES**

Fiches de synthèse :

- Les Alcanes
- Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques
- Les Solvants chlorés

NB : Les fiches proposées reprennent les principales informations sur la biodégradation des composés organiques étudiés en s'appuyant sur les informations retrouvées dans la bibliographie et spécifiées dans les tableaux récapitulatifs des principaux métabolites (voir chapitres précédents). **L'ensemble des molécules de chaque famille chimique ne sont pas représentées puisque seules celles permettant d'aboutir à l'identification de métabolites et pour lesquelles les données étaient complètes permettent la représentation sous forme de fiches de synthèse (avec schéma de dégradation).**

Les fiches de synthèse se présentent en format ppt avec des liens hypertextes difficilement représentables en format word. C'est pourquoi dans les annexes ne seront présentés que les bilans de dégradation. Un support informatique contenant l'ensemble des fiches réalisées en format ppt est fourni avec le rapport lors du rendu final.

Néanmoins, afin d'explicitier la procédure d'utilisation des fiches, un modèle est proposé avec les liens hypertextes ci après en prenant comme exemple le chlorométhane.

# Biodégradation aérobie du chlorométhane (Vanelli et al., 1998)

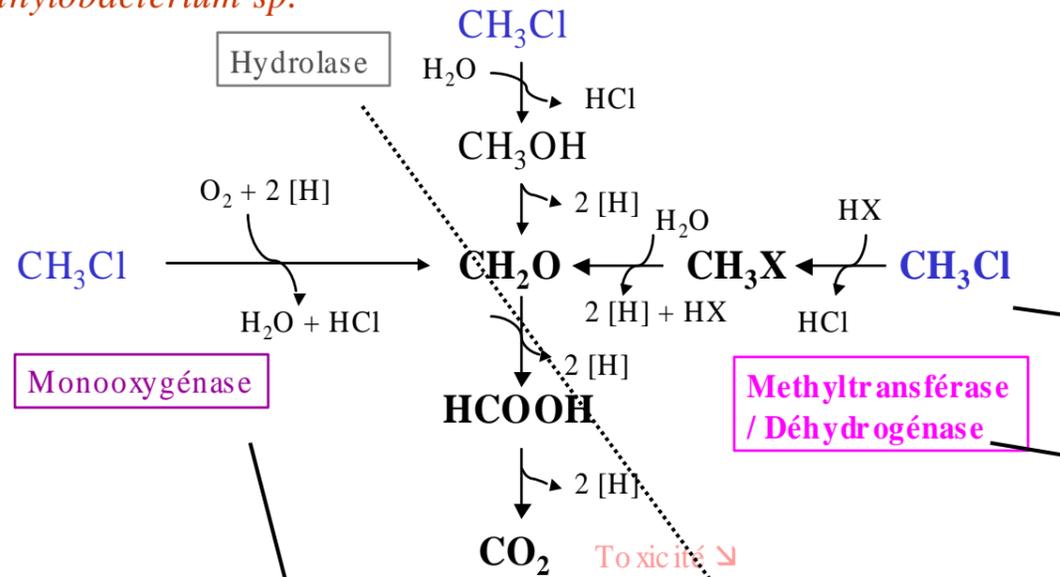
*Methylobacterium sp.*

*Methylobacterium sp.*

**Exemple de fiche avec lien hypertexte (ici, la fiche concernant la dégradation aérobie du chlorométhane)**

## Toxicité du CM

- Cas n° 74-873
- DL50<sub>orale</sub> = 500-5000 mg/kg (rat)
- RfC = 0,09 mg/m<sup>3</sup>
- Mutagène (Ames)
- Groupe D
- CE50<sub>48h</sub> = 200 mg/l (daphnie)



- Souche CM4
- Protéobactérie méthylotrophe aérobie
- Habitat : commun dans les sols et à la surface des feuilles et d'autres parties végétales

Conditions expérimentales

**Bilan :** 1 mol CM produit 1 mol de CO<sub>2</sub>  
1 mol HCOOH consomme 1,5 mol d'O<sub>2</sub>

## Conditions expérimentales

- Température = 30°C
- pH = 7,2 (ajout NaOH 5M)
- [CH<sub>3</sub>Cl]<sub>final</sub> = 2% (vol/vol)
- Taux de croissance = 0,12 h<sup>-1</sup>

## Déhalogénéation hydrolytique

- Formation de méthanol et d'acide formique sans demande d'oxygène
- Mécanisme proposé précédemment pour la dégradation du 1,2-DCA par *Xanthobacter autotrophicus*

## Méthyltransférase/déhydrogénase

- Formation de **formaldéhyde (IARC groupe 1)** avec comme groupe méthyle accepteur soit du glutathion soit un groupe thiol catalytique protéique
- Voie prioritaire (résultats de l'étude de Vanelli et al.)

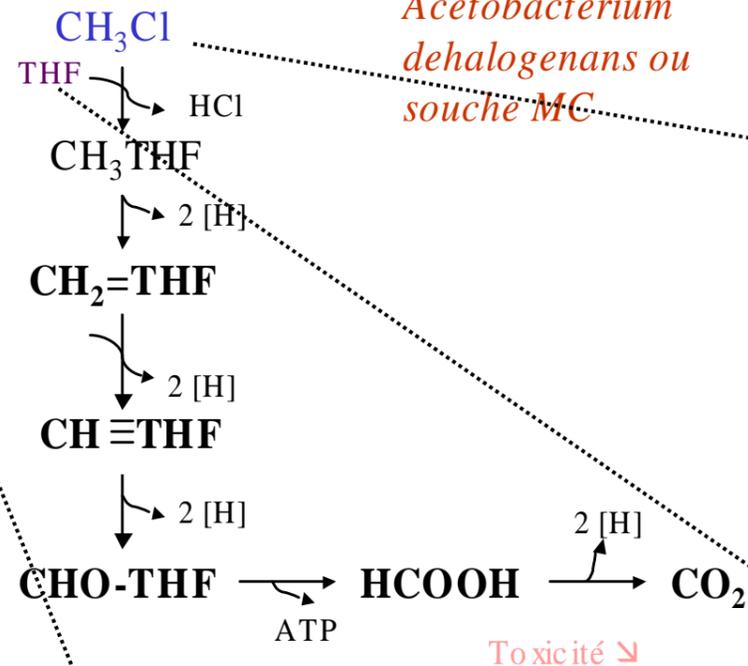
## Monooxygénation

- 1<sup>ère</sup> étape = Formation d'un composé chlorhydrine instable
- 2<sup>ème</sup> étape = Formation du formaldéhyde par élimination abiotique du chlore
- Mécanisme proposé précédemment pour la dégradation du CM par *Hyphomicrobium MC1*

**NB les flèches indiquent les liens hypertextes**

Biodégradation anaérobie du chlorométhane (Messmer et al., 1993 cité par *de Best, 1999*)

Chlorométhane déhalogénase



Conditions expérimentales

Conditions expérimentales

- Température = 25°C
- pH = 7,3-7,7
- [CH<sub>3</sub>Cl]<sub>final</sub> = 2-3 % dans la phase gazeuse
- Taux de croissance = ??
- Culture en batch, en laboratoire

*Acetobacterium dehalogenans* ou souche MC

*Acetobacterium dehalogenans*

- Souche MC
- Bactérie homoacétogène anaérobie
- Habitat : isolée de la flore anaérobie de boues municipales digérées

Toxicité du CM

- Cas n° 74-873
- DL50<sub>orale</sub> = 500-5000 mg/kg (rat)
- RfC = 0,09 mg/m<sup>3</sup>
- Mutagène (Ames)
- Groupe D
- CE50<sub>48h</sub> = 200 mg/l (daphnie)

Tétrahydrofolate

- dérivé de l'acide folique
- Transporteur d'unités mono-carbonées activées (synthèse des acides nucléiques)

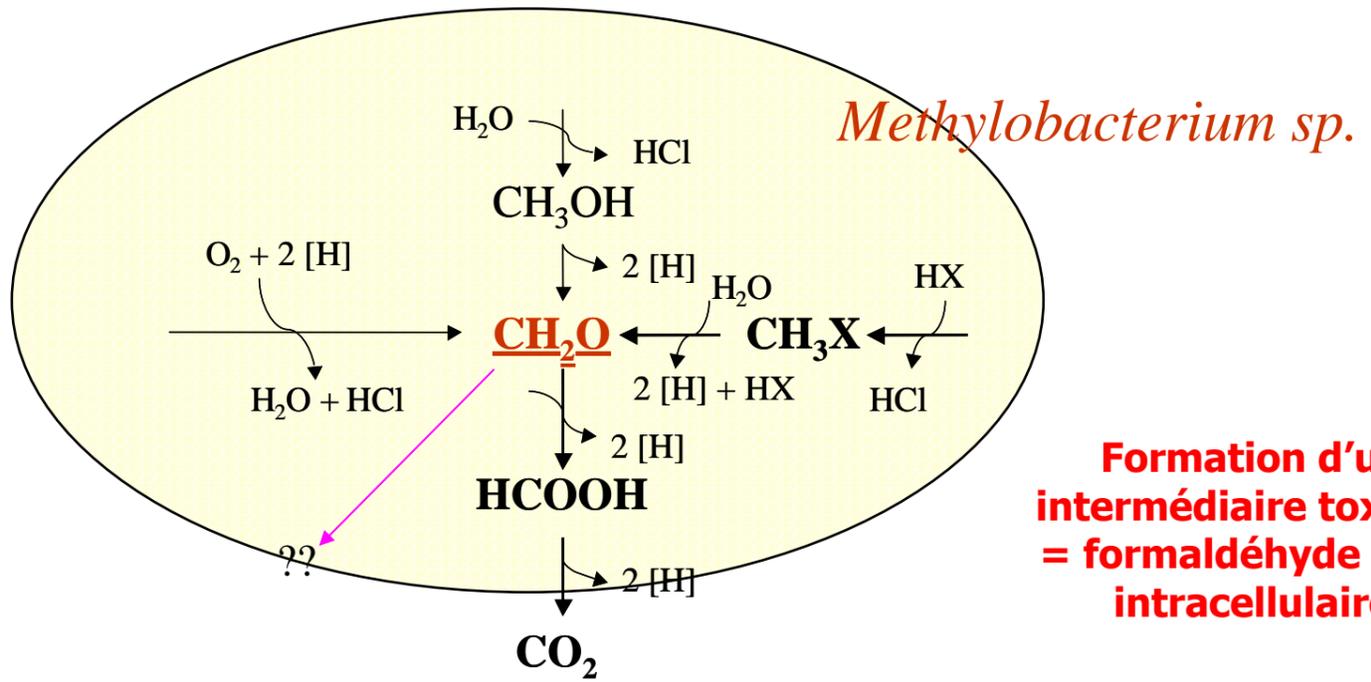
Chlorométhane déhalogénase

- Transfert le groupe -méthyle du CM par l'intermédiaire d'une protéine corrinoïde
- Voie prioritaire (résultats de l'étude de *Vanelli et al.*)

NB les flèches indiquent les liens hypertextes

Exemple de fiche avec lien hypertexte (ici, la fiche concernant la dégradation anaérobie du chlorométhane)

**Bilan proposé pour le chlorométhane**

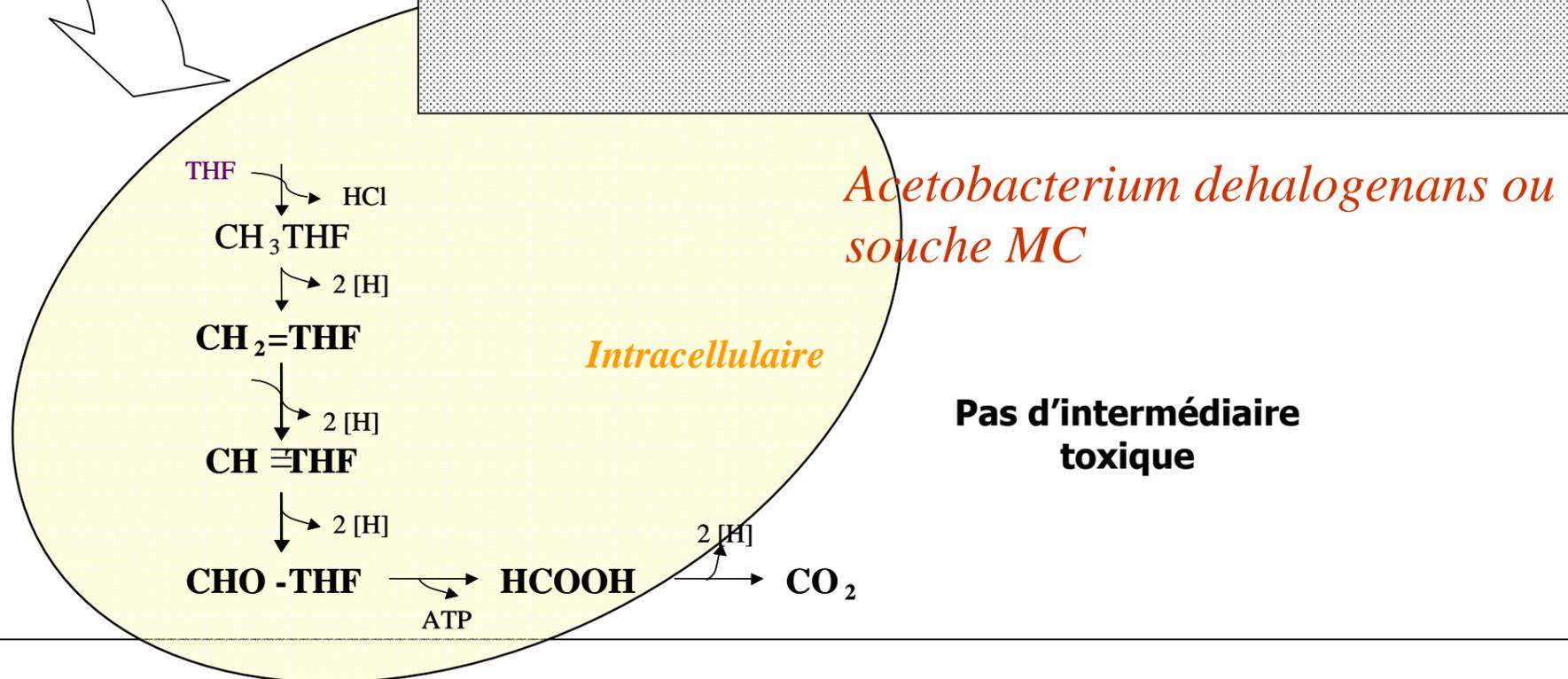


**Formation d'un intermédiaire toxique = formaldéhyde mais intracellulaire**

Couche supérieure aérobie

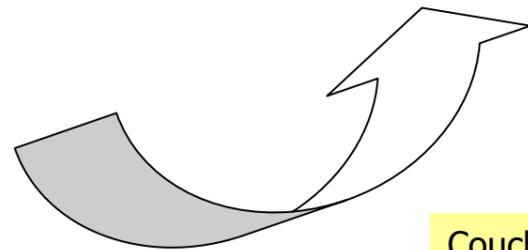
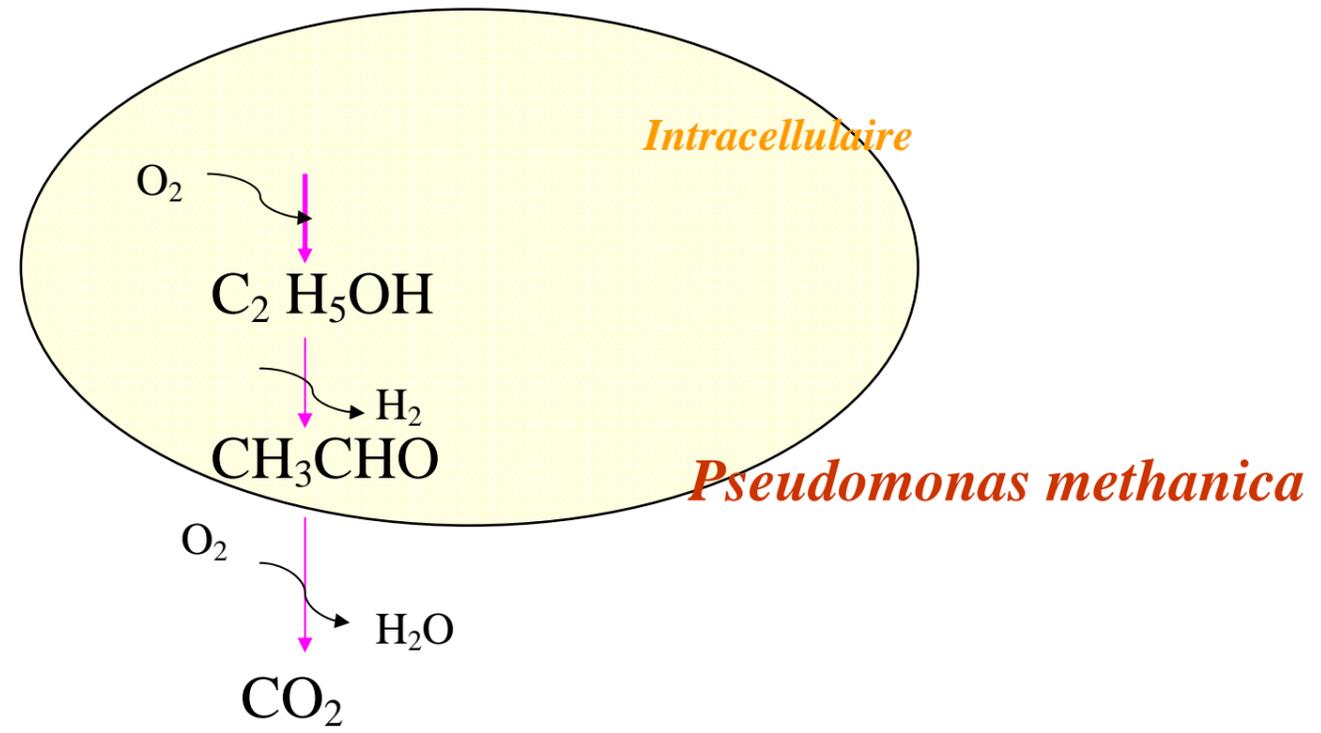


Couches pauvres en O<sub>2</sub>



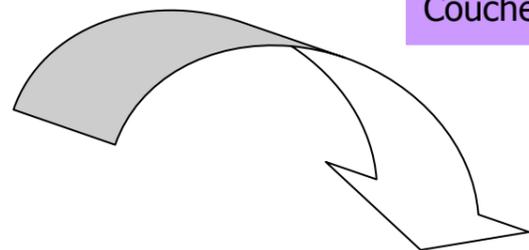
# LES ALCANES

**Bilan proposé pour l'éthane**



Couche supérieure aérobie

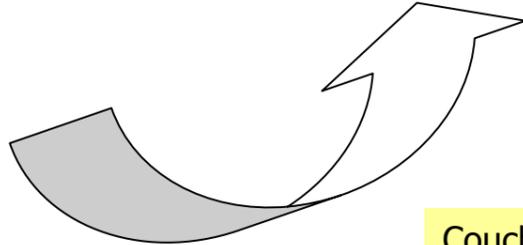
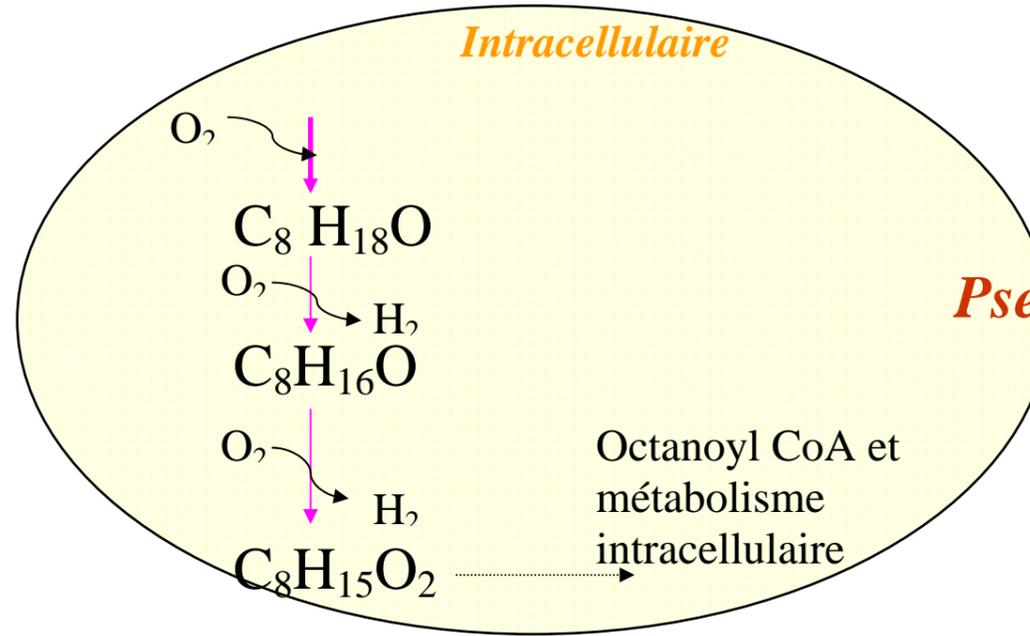
**$C_2H_6$**



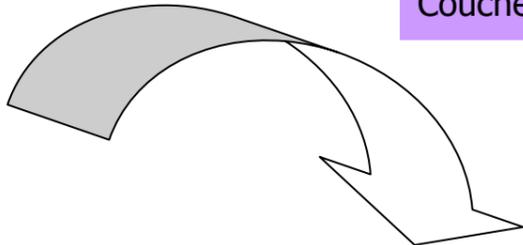
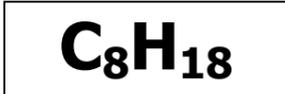
Couches pauvres en  $O_2$

??

**Bilan proposé pour l'octane**



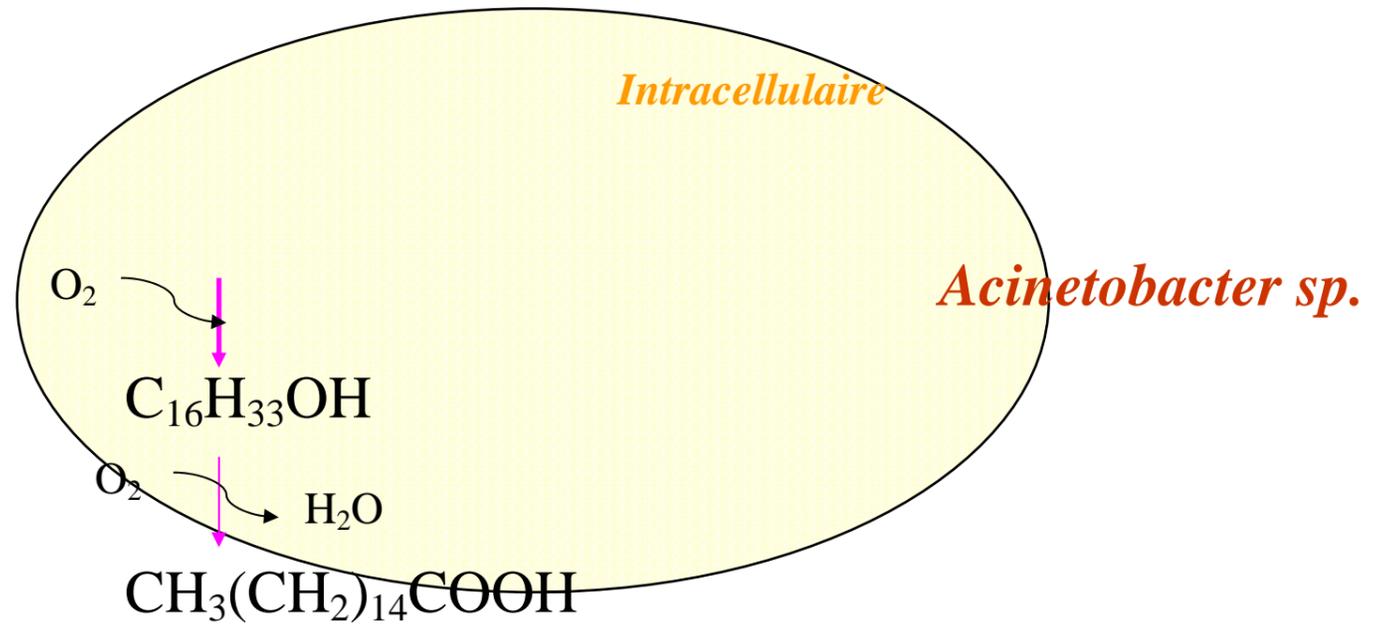
Couche supérieure aérobie



Couches pauvres en  $O_2$

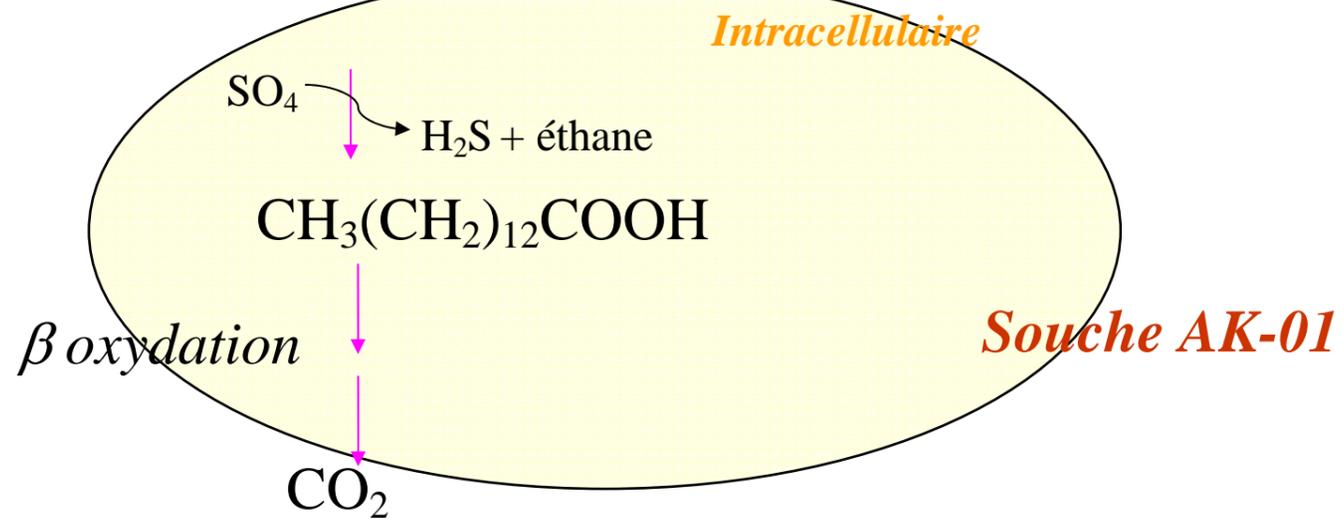
??

**Bilan proposé pour l'hexadécane**



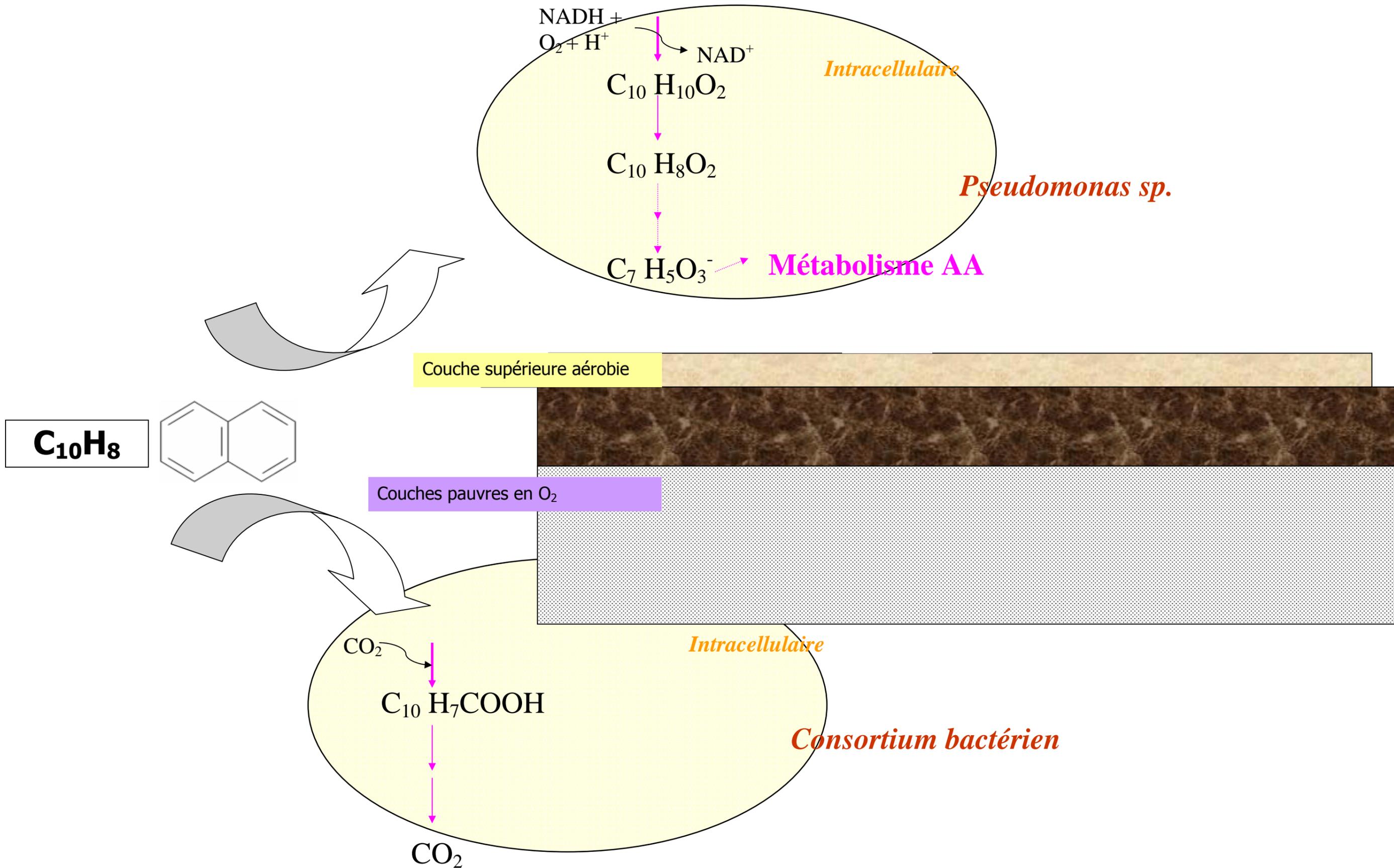
Couche supérieure aérobie

Couches pauvres en  $O_2$

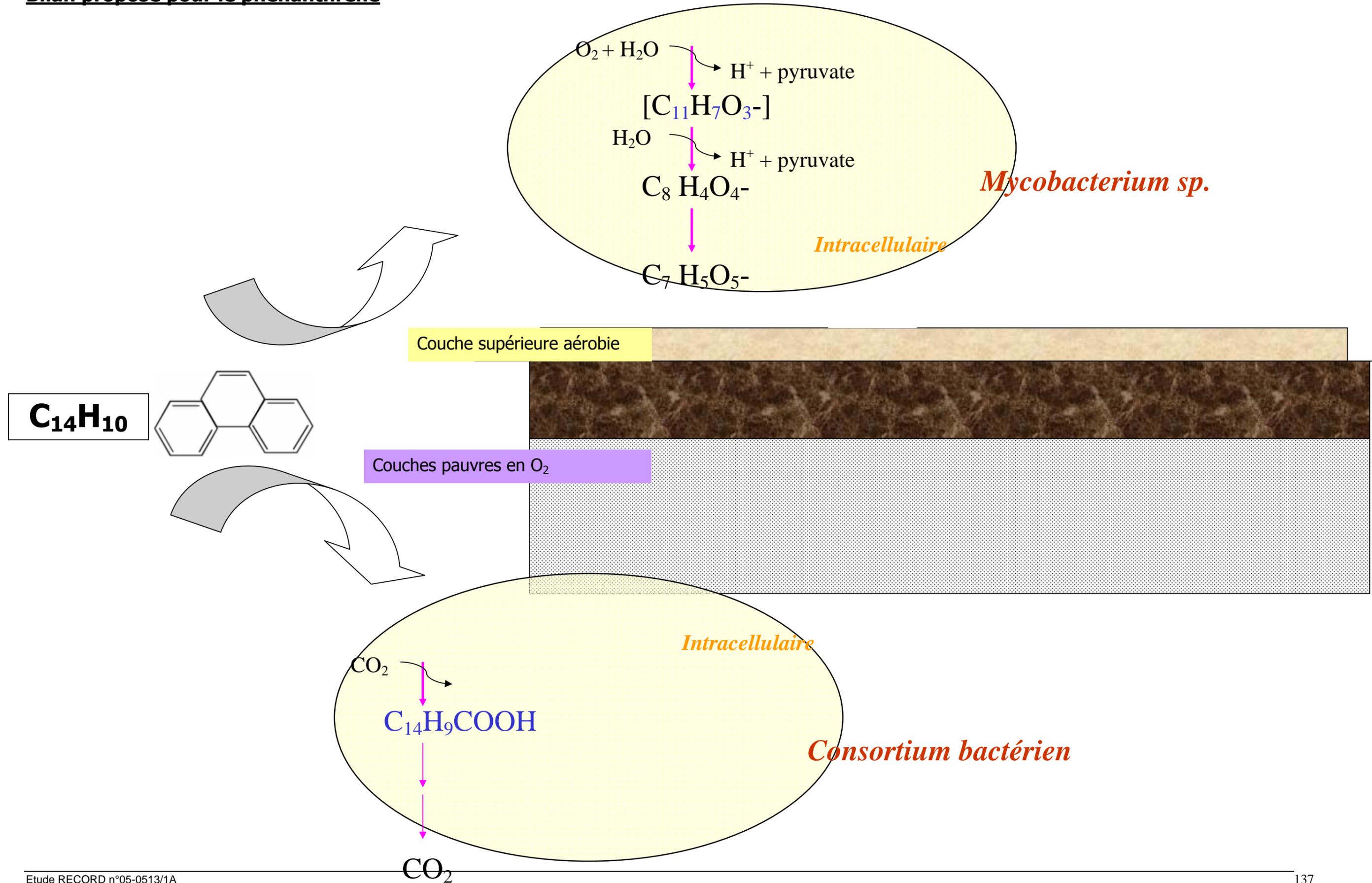


# **LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES**

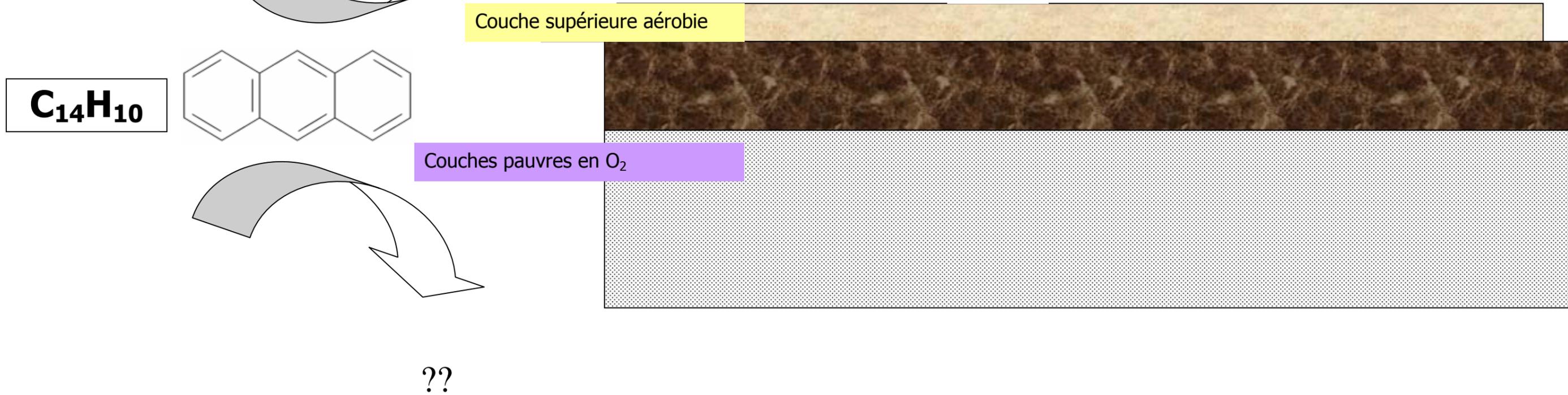
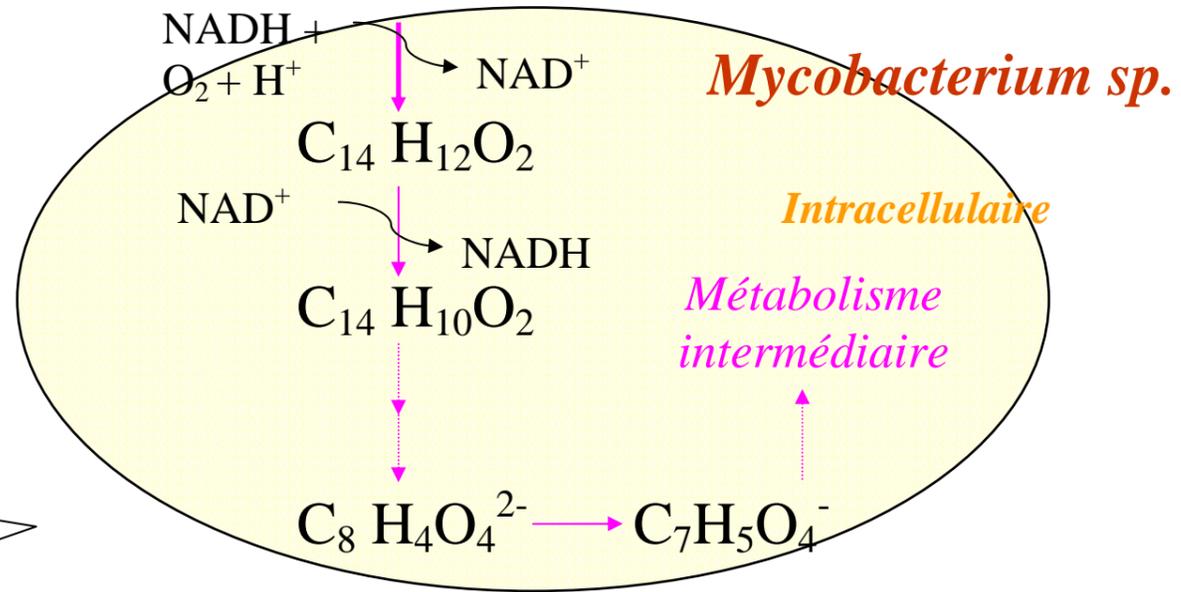
**Bilan proposé pour le naphthalène**



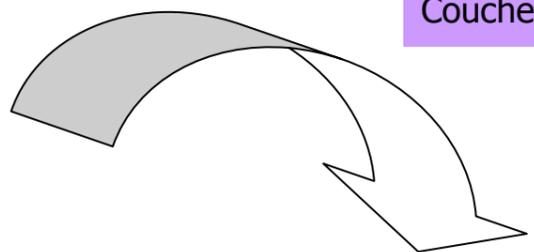
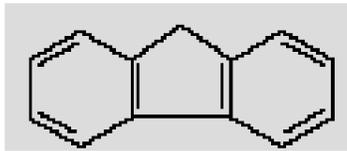
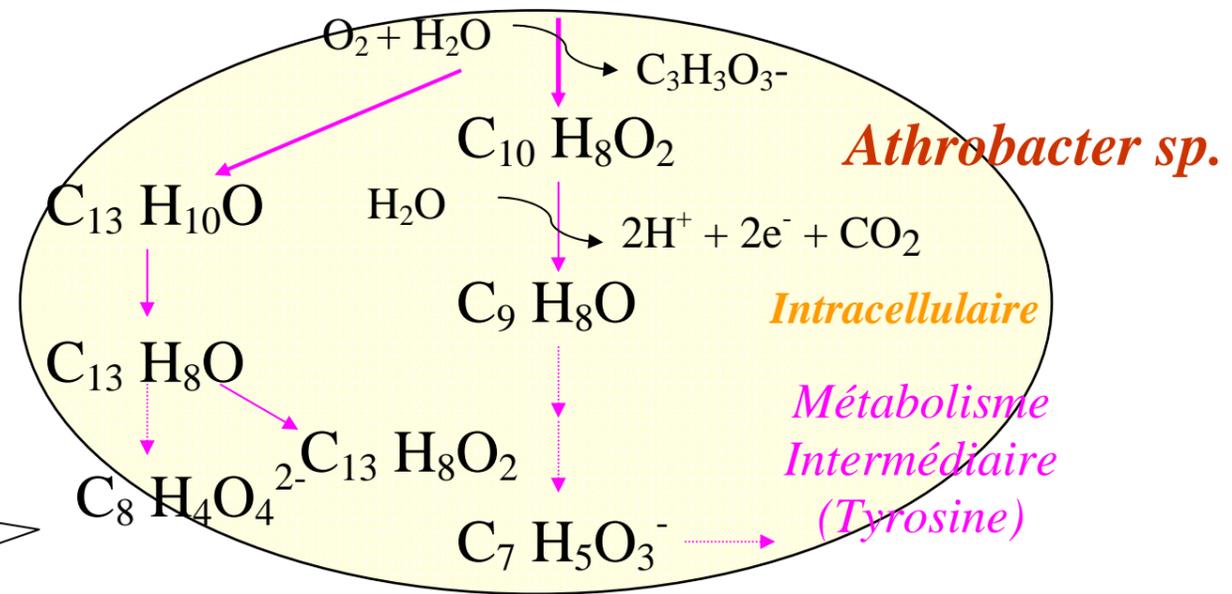
**Bilan proposé pour le phénanthrène**



**Bilan proposé pour l'antracène**



**Bilan proposé pour le fluorène**

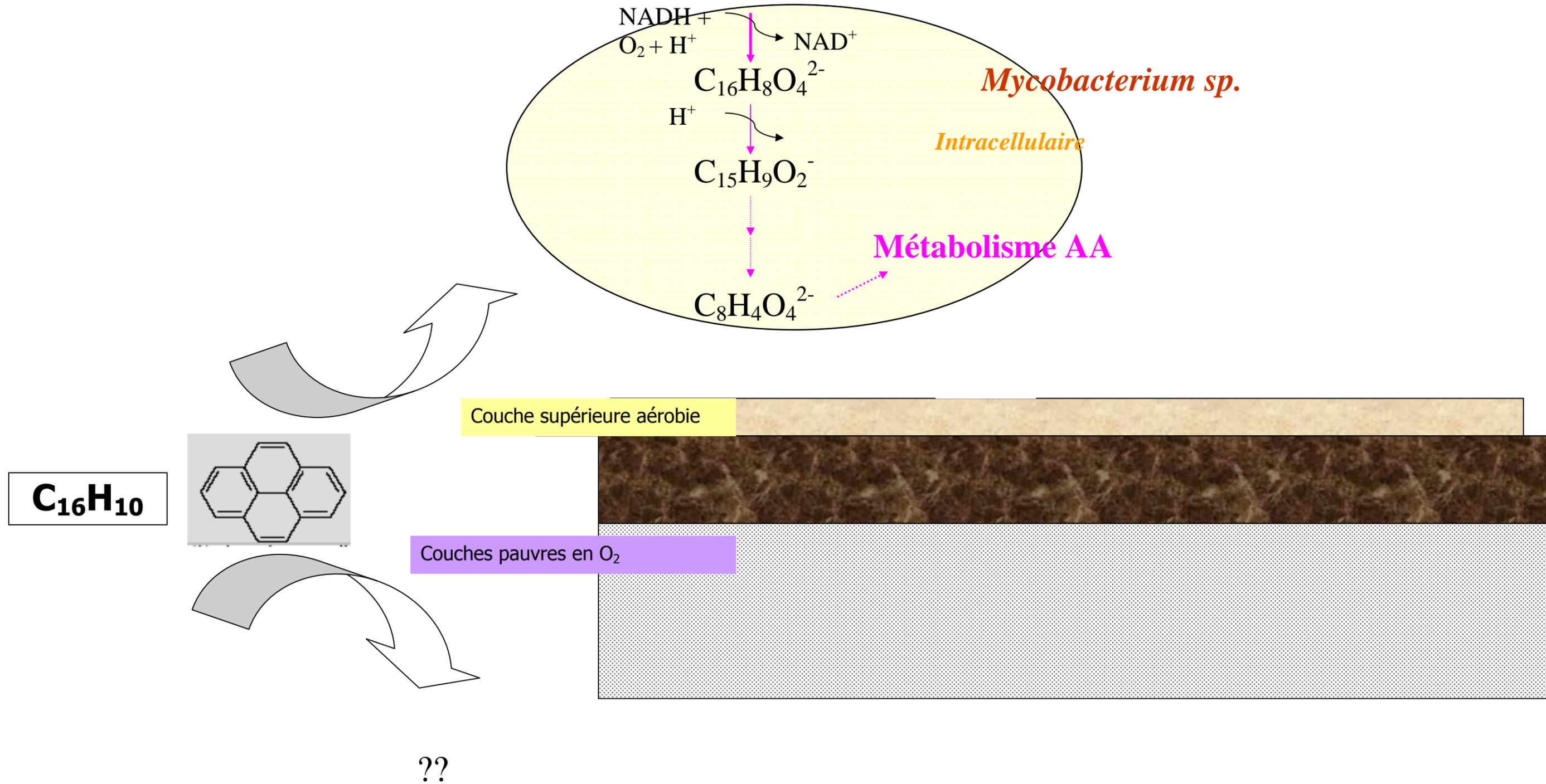


Couche supérieure aérobie

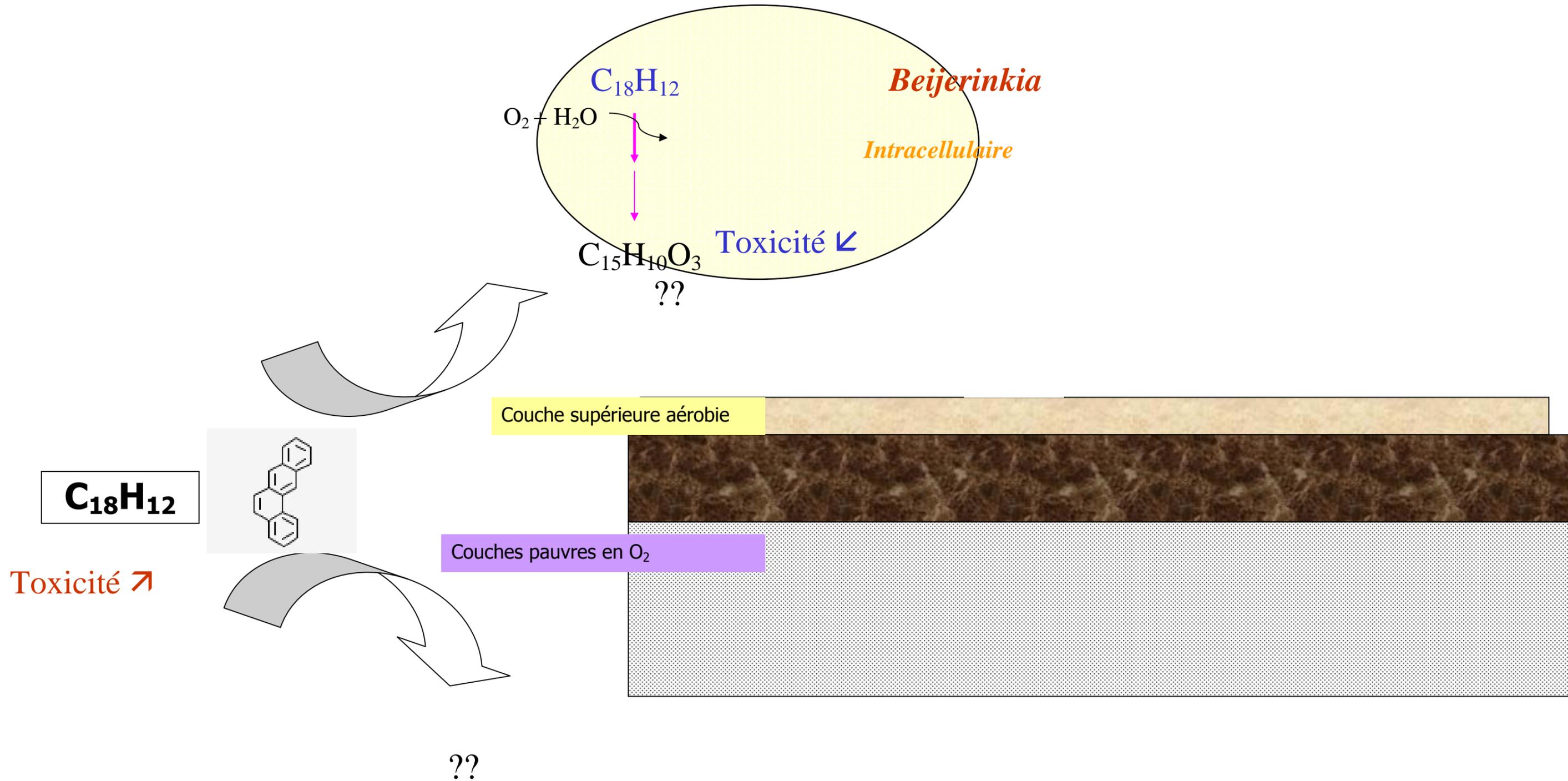
Couches pauvres en O<sub>2</sub>

??

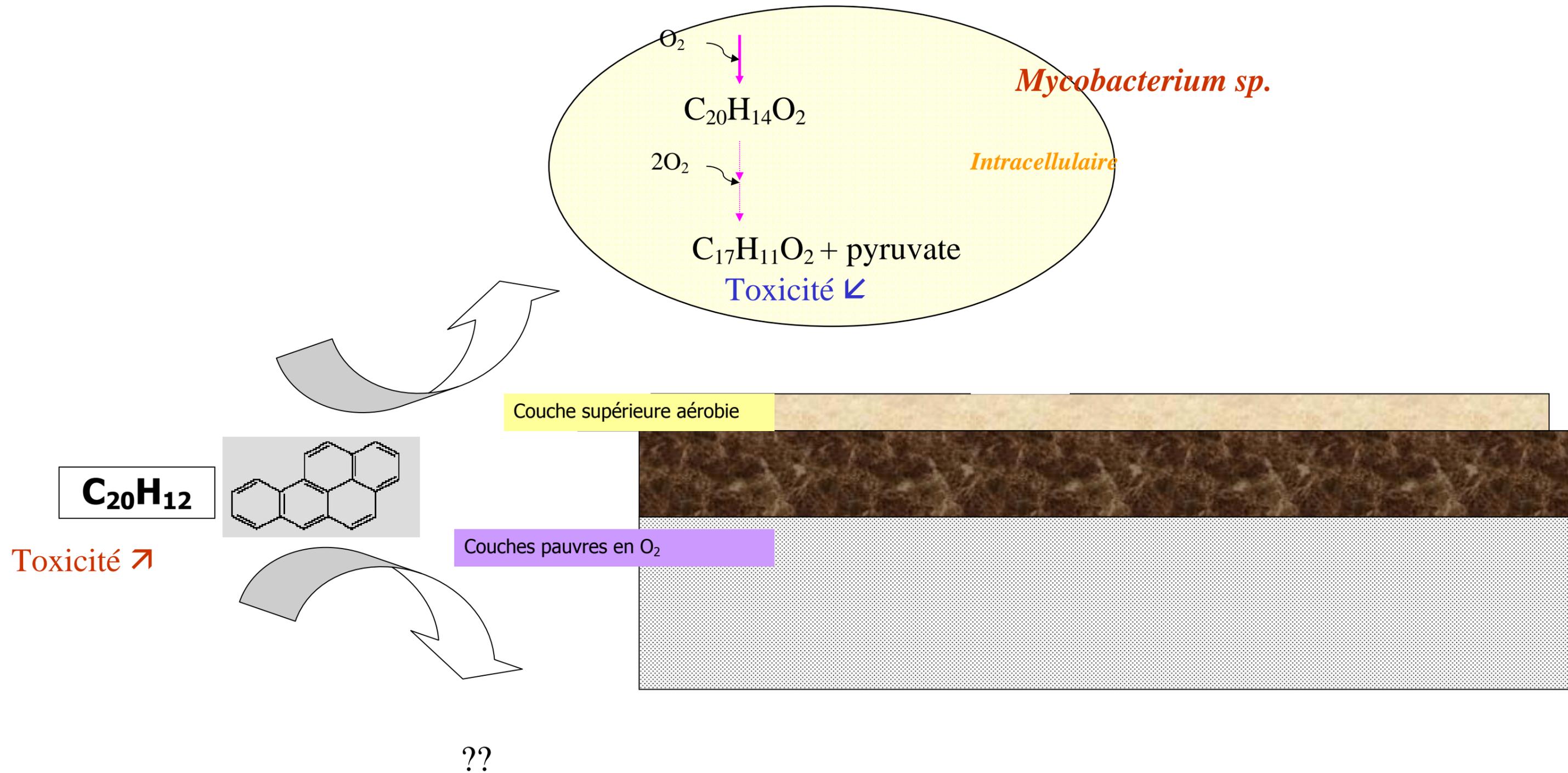
**Bilan proposé pour le pyrène**



**Bilan proposé pour le benzo(a)anthracène**

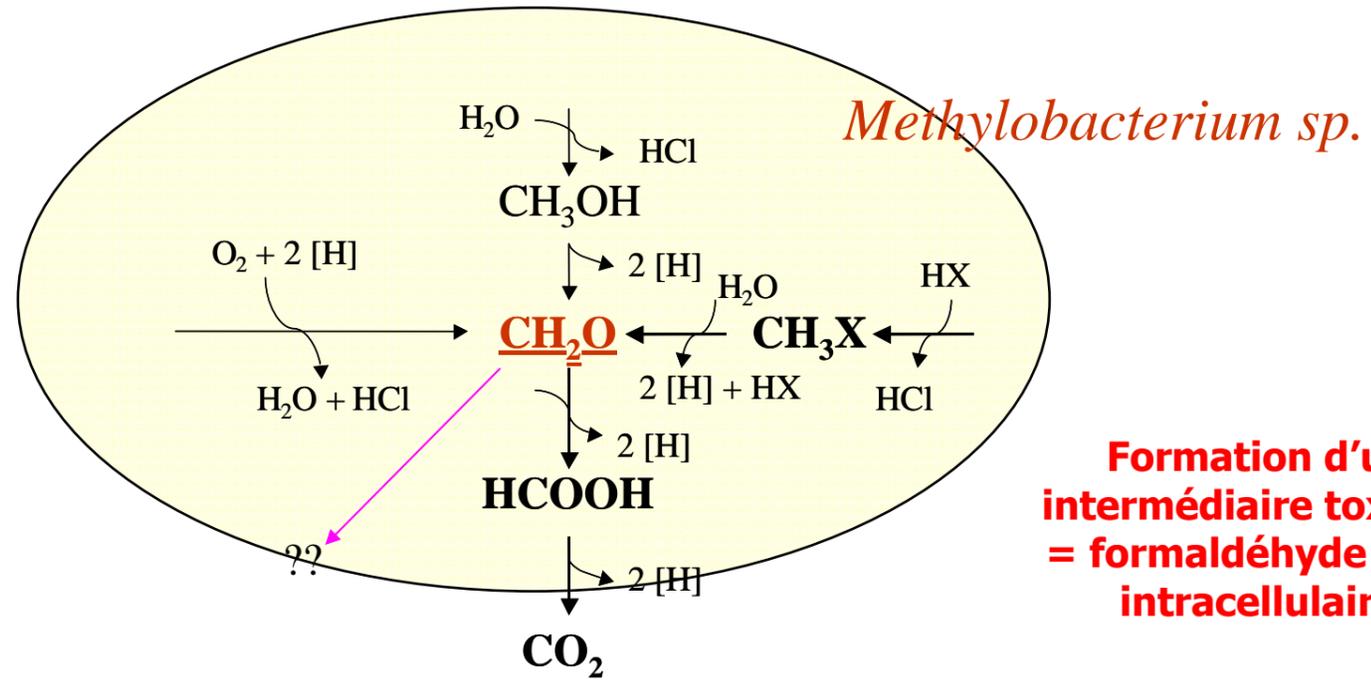


**Bilan proposé pour le benzo(a)pyrène**



# **LES SOLVANTS CHLORES**

**Bilan proposé pour le chlorométhane**

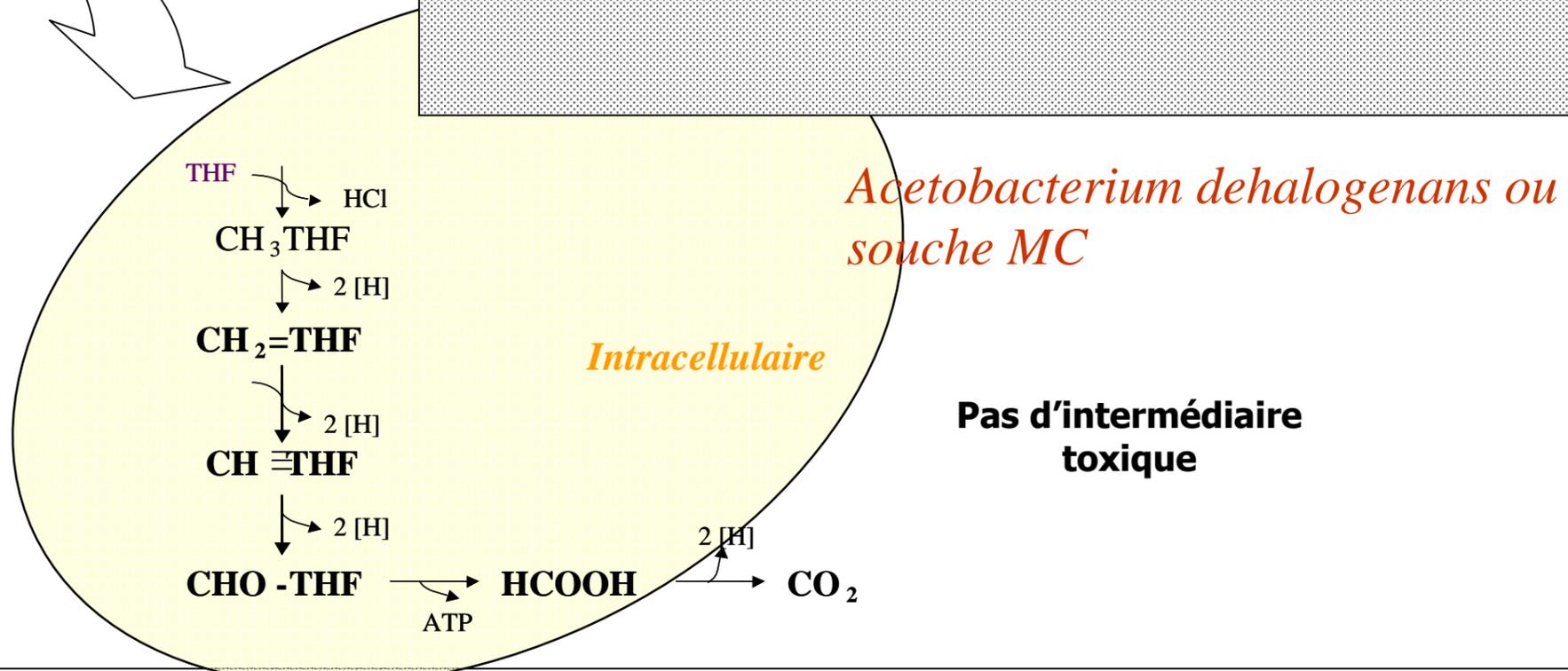


**Formation d'un intermédiaire toxique = formaldéhyde mais intracellulaire**

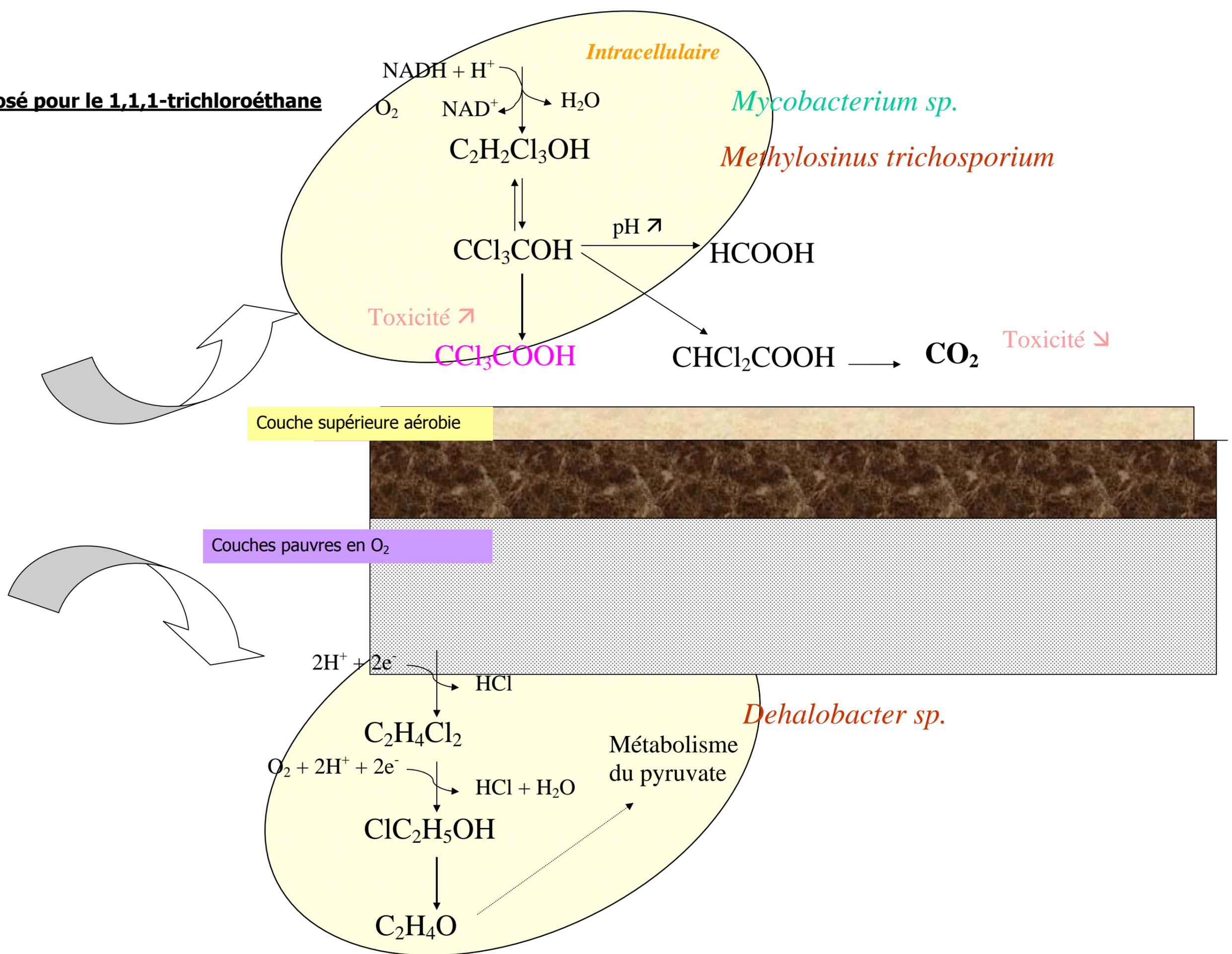
Couche supérieure aérobie



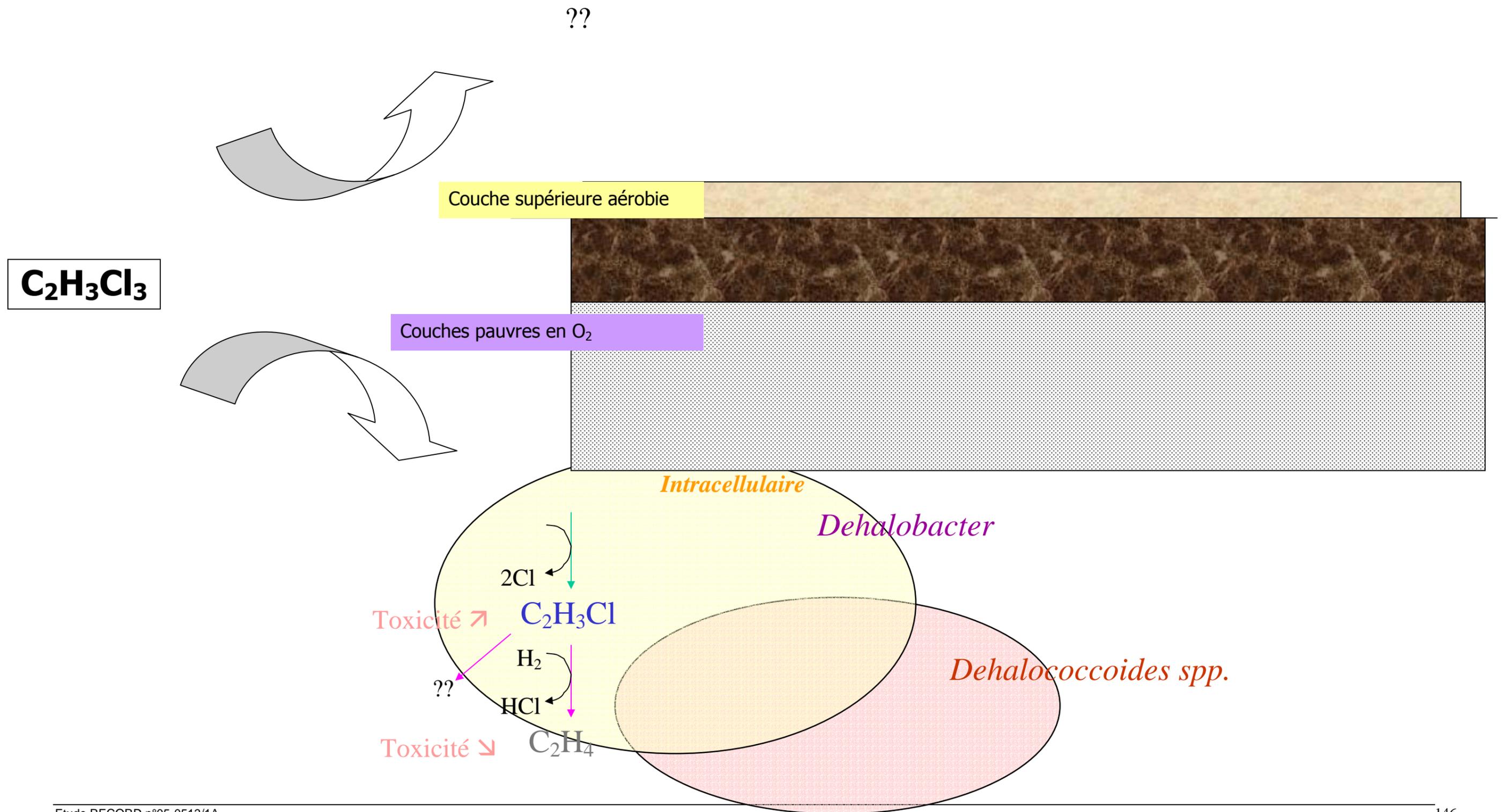
Couches pauvres en O<sub>2</sub>



**Bilan proposé pour le 1,1,1-trichloroéthane**



**Bilan proposé pour le 1,1,2-trichloroéthane**



# Bilan proposé pour le 1,1,2,2-tetrachloroéthane

