



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 6 novembre 1995

Pour obtenir le titre de
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE
HENRI POINCARÉ - NANCY I**
Mention Chimie et Microbiologie de l'Eau



par

Sandrine MAGDALINIUK

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies Chimie et Microbiologie de l'Eau

BIODISPONIBILITE DU NAPHTALENE DANS DES SUSPENSIONS ARGILEUSES

MEMBRES DU JURY

Président : J. BERTHELIN, Professeur (INPL - CNRS, Vandoeuvre, France)

Juges : J.C. BLOCK, Professeur (Université Henri Poincaré - Nancy I, France)
J.Y. BOTTERO, Professeur (Université Aix Marseille, Les Milles, France)
K. KEIDING, Professeur (Université d'Aalborg, Danemark)
T. VOGEL, Professeur (Université du Michigan, Etats-Unis)

Rapporteurs : P. BAVEYE, Professeur (Université Cornell, Etats-Unis)
F. THOMAS, Docteur (INPL - CNRS, Vandoeuvre, France)

J



104 026601 7

FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Année Universitaire 1995/1996

Membres du personnel enseignant

Doyen : C. VIGNERON

Vice Doyen : G. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
M^{lle} BESSON Suzanne
M^{lle} GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacodynamie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologie
M ^{lle}	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
M ^{me}	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
M ^{lle}	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Botanique
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	KERGOSIEN Yannick	Mathématiques - Biophysique
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	LECTARD Pierre	Biologie végétale et Cryptogamie
M.	LEMAY René	Droit et économie pharmaceutique
M.	LOPPINET Vincent	Chimie thérapeutique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M ^{me}	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe Anglais

ASSISTANTS

Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	MOUREY Michèle	Cryptogamie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M.	DAHAOUI Slimane	Biophysique - Mathématiques
Mlea	GAVRILOFF Catherine	Chimie Analytique
Mme	MENDES-PELLERIN Christina	Biologie cellulaire - Hématologie
Mle	UBRICH Nathalie	Biophysique - Mathématiques
M.	VIARD Benoît	Biochimie

MONITEURS D'INITIATION A L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Mle	EVRARD Anne	Biochimie clinique
Mle	FENAUZ Marie Laure	Cytologie - Hémostase
M.	GASPARD Philippe	Initiation à la connaissance du médicament
Mle	MAGDALINIUK Sandrine	Biologie cellulaire
Mle	MAURICE Marie Hélène	Toxicologie
Mle	PARMENTIER Christine	Chimie analytique
M.	SOETENS Jean Christophe	Biomathématiques

DOCTEURS HONORIS CAUSA

M.	ANDERSON Norman G.	Illinois	USA
M.	BETTOLO Marini	Rome	ITALIE
M.	BLOCH Konrad E.	Massachusetts	USA
M.	BOVET Daniel	Rome	ITALIE
M.	DUTTON Geoffrey J.	Dundee	ECOSSE
M.	GHUYSEN Jean Marie	Liège	BELGIQUE
M.	HEIDELBERGER	New Jersey	USA
M.	KOFOD Helmer	Copenhague	DANEMARK
M.	PARRES FARRAS Ramon	Barcelone	ESPAGNE

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	AZRIA	Pharmacologie
M.	BARADEL	Conseils vétérinaire
Mme	BLOCH	Gynécologie
M.	CAMUZEUX	Maintien à domicile
M.	CHARPIGNON	Gestion, Commercialisation
M.	DANOUX	Comptabilité
M.	DEMANGE	Pharmacie clinique
M.	DOUCHE	Services de la distribution pharmaceutique
Mme	EVRARD	Services de la distribution pharmaceutique
M.	FRANCAIS	Services de la distribution pharmaceutique
M.	GABLE	Maintien à domicile
M.	GIESENFELD	Pharmacie clinique
Mme	GILGENKRANTZ	Génétique
M.	HACHET	Services de la distribution pharmaceutique
M.	JACQUOT	Assurance - qualité
M.	JOUAULT	Services de la distribution pharmaceutique
M.	JOUZEAU	Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments
Mme	LABAEYE	Audiologie
M.	LAMOTTE	Physique (acoustique)
M.	LE FLOC'H	Gestion, Droit du travail, Droit commercial
M.	LEVIN	Services de la distribution pharmaceutique
M.	LOUIS	Sémiologie
Mle	MANGIN	Pharmacie clinique
M.	MAUARY	Sémiologie
M.	MAY	Maladies infectieuses
M.	NICOLAY	Anatomie
M.	PARDON	Services de la distribution pharmaceutique
Mle	PICAUT	Pharmacie clinique
M.	RENAUX	Secourisme
M.	RETOURNARD	Electronique
M.	ROLLET	Secourisme
M.	ROUYER	Législation, Podologie, Orthopédie
M.	SIMON	Audiologie
M.	TURKAWKA	Relations humaines, techniques de la communication
Mle	WOLF	Services de la distribution pharmaceutique

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M	BAVEYE Philippe	Santé - Environnement
M.	BODEMEIER Roland	Pharmacie Galénique
Mle	CHARGOIS Anne	Pharmacologie
M.	O'KANE Maurice	Biochimie
M.	SHUVAEV Vladimir	Biochimie
Mme	STOÏANOV Marina	Biochimie clinique
Mme	STREIBLOVA Eva	Biochimie microbienne
M.	VAN STRALEN Paul	Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie Analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen - Sûreté industrielle
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle	FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
Mme	HOFFMAN Marie Antoinette	Pharmacie Clinique
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE OU INVITE

M.	PURI Rajesh	Biologie cellulaire
----	-------------	---------------------

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury qui ont eu l'amabilité d'accepter cette tâche quelque peu contraignante.

Merci à Jean-Claude, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir soutenue tout au long de ces trois années,

Merci à Messieurs Fabien Thomas et à Philippe Baveye qui me font l'honneur de juger et de critiquer ce travail,

Merci à Jean-Yves Bottero, Jacques Berthelin, Kirstian Keiding et Tim Vogel pour m'avoir fait part de leurs remarques ainsi que pour le temps qu'ils m'ont consacré,

Merci à l'Agence de l'Eau Rhin Meuse pour son soutien financier,

Et merci à Jacques Yvon, Jean-François Delon, Geneviève Villemenin, Corinne Leyval, Colette Lamy, Dominique Notter, et tous les chercheurs qui m'ont activement aidée,

Et surtout, Abdel, Anne, Bernadette, Carole, Fabienne, Fred, Gérard, Laurence, Marie-Laure, Monique, Patrice, Seb, Sylvain, Vincent, Virginie, mais aussi Céline et Fred...

Je souhaite rendre tout particulièrement hommage à ma famille pour le soutien et le réconfort qu'elle m'a sans cesse apportés.



SOMMAIRE GENERAL

Chapitre 1. Introduction.....	1
Chapitre 2. Analyse bibliographique : Biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement.....	7
2.1. Introduction.....	7
2.2. Biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement.....	8
2.2.1. Estimation de la biodisponibilité d'un polluant organique.....	8
2.2.2. Observations de la modification de la biodisponibilité.....	9
2.2.3. Artefacts et biais.....	14
2.2.3.1. Effet du temps de séjour.....	14
2.2.3.2. Etudes de terrain.....	15
2.2.3.3. Transformations abiotiques.....	16
2.3. Mécanismes limitant la biodisponibilité.....	16
2.3.1. Immobilisation des microorganismes.....	16
2.3.2. Immobilisation du contaminant.....	18
2.3.2.1. Accumulation à la surface.....	18
2.3.2.2. Transfert de masse.....	21
3.3.2.2.1. Transfert de masse externe.....	21
3.3.2.2.2. Transfert de masse interne.....	22
2.4. Modélisation des mécanismes limitant la biodisponibilité.....	23
2.4.1. k_p et sorption.....	23
2.4.1.1. Cinétiques de sorption.....	24
2.4.1.2. Cinétiques d'adsorption prenant en compte la diffusion.....	26
2.4.1.3. Isothermes.....	28
2.4.1.4. Les QSARS.....	29
2.4.2. Modèles intégrant sorption et biodégradation.....	31
2.4.3. Sorption / transfert de masse / biodégradation.....	34
2.4.4. Les nombres adimensionnels.....	37
2.5. Conclusions et perspectives.....	38
2.6. Références bibliographiques.....	40
Chapitre 3. Matériel et méthodes.....	50
3.1. <i>Burkholderia cepacia</i>	50
3.1.1. Identification de <i>Burkholderia cepacia</i>	50
3.1.1.1. La coloration de Gram.....	50
3.1.1.2. Le test oxydase.....	50
3.1.1.3. Profil enzymatique.....	51
3.1.2. Test d'adhésion à l'octane.....	51

3.1.3. Numération des bactéries cultivables sur milieu gélosé.....	52
3.1.4. Numération du nombre total de bactéries.....	52
3.2. Milieu minéral.....	53
3.3. Milieu naphthalène.....	54
3.4. Préparation des supports adsorbants.....	54
3.4.1. Montmorillonite sodique	54
3.4.2. Complexe montmorillonite sodique / polyacrylamide neutre.....	56
3.4.3. Argile organique (montmorillonite + tensioactif) B34	57
3.4.4. Sédiment	58
3.5. Dosage du carbone organique dissous (COD).....	58
3.6. Dosage du naphthalène.....	58
3.7. Extraction du naphthalène adsorbé.....	59
3.8. Dosage des cations (NH ₄ , K.....	59
3.9. Méthode d'ensemencement des essais de biodégradation	60
3.10. Observations en microscopie électronique.....	61
3.10.1. Microscopie électronique à balayage	61
3.10.2. Microscopie électronique à transmission.....	61
3.10.3. Colorations spécifiques des coupes pour la MET.....	62
3.10.3.1. Coloration de contraste	62
3.10.3.2. Mise en évidence des protéines.....	63
3.10.3.3. Mise en évidence des polysaccharides (réaction de Thiery).....	63
3.11. Modèles.....	64
3.11.1. Cinétiques d'adsorption et de désorption	64
3.11.2. Isothermes d'adsorption et de désorption.....	64
3.11.3. Volatilisation	65
3.11.4. Déduction de la volatilisation.....	65
3.11.5. Cinétiques de biodégradation.....	65
3.11.6. Calcul de la diffusivité du naphthalène à une température donnée.....	66
3.11.7. Diffusion dans la couche limite	66
3.11.8. Calcul de la diffusivité du naphthalène à travers une membrane.....	67
3.11.9. Calcul de la diffusivité intraparticulaire du naphthalène	68
3.12. Chambres de mesure de diffusion	68
3.13. Références bibliographiques.....	69
 Chapitre 4. Interactions du naphthalène avec des particules argileuses en milieu aqueux	 73
4.1. Introduction.....	73
4.2. Protocole expérimental.....	75
4.2.1. Perte du naphthalène par adsorption sur les parois et par volatilisation	75

4.2.2. Cinétiques d'adsorption du naphthalène	76
4.2.3. Cinétiques de désorption	77
4.2.4. Isothermes d'adsorption.....	77
4.2.5. Isothermes de désorption.....	78
4.2.6. Gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène	78
4.3. Résultats.....	79
4.3.1. Perte de naphthalène par volatilisation et adsorption sur les parois.....	79
4.3.2. Cinétiques d'adsorption et de désorption du naphthalène.....	80
4.3.3. Isothermes d'adsorption et de désorption	86
4.3.4. Gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène	91
4.4. Discussion.....	92
4.5. Conclusions.....	94
4.6. Références bibliographiques	95
Chapitre 5. Biodégradation du naphthalène en présence de suspensions argileuses	100
5.1. Introduction	100
5.2. Protocole expérimental.....	102
5.2.1. Biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite.....	102
5.2.1.1. Biodégradation du naphthalène en présence de 0,5gL ⁻¹ de montmorillonite.....	102
5.2.1.2. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de montmorillonite.....	103
5.2.2. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe argile/polyacrylamide	103
5.2.2.1. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de complexe	103
5.2.2.2. Biodégradation du naphthalène en présence de polyacrylamide .	103
5.2.3. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34.....	104
5.2.3.1. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations en B34	104
5.2.3.2. Influence de la concentration initiale en naphthalène.....	104
5.2.3.3. Essais de biodégradabilité du tensioactif.....	105
5.2.4. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment	105
5.3. Résultats.....	106
5.3.1. Biodégradation du naphthalène en milieu aqueux.....	106
5.3.2. Biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite.....	108
5.3.3. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe montmorillonite/polyacrylamide	110

5.3.4. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34.....	112
5.3.5. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment de rivière	118
5.4. Discussion.....	121
5.5. Conclusion.....	124
5.6. Références bibliographiques	126
Chapitre 6. Paramètres contrôlant la biodisponibilité du naphthalène.....	131
6.1. Introduction	131
6.2. Protocole expérimental.....	133
6.2.1. Biodégradation du naphthalène avec 0,5gL ⁻¹ de montmorillonite sous différentes vitesses d'agitation.....	133
6.2.2. Diffusion du naphthalène à travers une membrane : Influence de la présence de montmorillonite	133
6.2.3. Biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et dans un milieu échangé par du sodium	134
6.3. Résultats.....	134
6.3.1. Transfert de masse externe.....	134
6.3.1.1. Distribution, granulométrie des suspensions argileuses et observations microscopiques	134
6.3.1.2. Biodégradation du naphthalène avec 0,5gL ⁻¹ de montmorillonite à différentes vitesses d'agitation.....	139
6.3.1.3. Diffusion du naphthalène à travers une membrane : Influence de la présence de montmorillonite.....	141
6.3.1.4. Diffusion dans la couche limite	142
6.3.2. Transfert de masse interne du naphthalène dans l'argile organique B34... ..	144
6.3.3. Biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et le milieu échangé ("surnageant de montmorillonite")	145
6.4. Discussion.....	148
6.5. Conclusion	150
6.6. Références bibliographiques	151
Chapitre 7. Conclusions générales.....	153
Annexes.....	156



CHAPITRE 1
INTRODUCTION

Le devenir des polluants organiques dans l'environnement est non seulement lié aux caractéristiques physico-chimiques des molécules (solubilité, volatilité) (Fetter, 1993; Schwarzenbach *et al.*, 1993) mais aussi aux caractéristiques du milieu dans lequel ils se trouvent (pH, force ionique, présence de matériau particulaire) (Kukkonen et Oikari, 1991; Scow et Alexander, 1992; Scow et Hutson, 1992). Les polluants sont soumis à des transformations abiotiques telles que les oxydations, les réductions, mais un des processus majeurs d'élimination reste la transformation par voie biologique : la biodégradation.

La biodégradation des molécules organiques se trouve modifiée en présence de particules solides. Malgré un nombre restreint d'études contradictoires, un consensus semble toutefois s'établir sur le fait que la présence de particules limite les cinétiques de biodégradation (Guerin et Boyd, 1992; Mihelcic et Luthy, 1992; Ogram *et al.*, 1985) ainsi que les quantités biodégradées (Gordon et Millero, 1985; Samuelsson et Kirchman, 1990). Ces particules constituent un support à la fois pour les molécules chimiques mais également pour les microorganismes et cette rétention contrôle le degré de biodisponibilité physico-chimique (Fu *et al.*, 1994) et biologique des polluants (Weber and Coble, 1968).

Bien que la littérature ne donne pas de définition de la biodisponibilité, on peut tenter de la définir comme le statut physique du polluant (forme solubilisée dans la phase aqueuse, ou dans une phase organique, forme adsorbée sur des particules solides) lui permettant d'être plus ou moins disponible à l'attaque des microorganismes. La biodisponibilité est appréciée grâce aux modifications des cinétiques de biodégradation. Néanmoins, dans l'environnement, la biodégradation peut être contrôlée non seulement par la biodisponibilité du polluant, mais également par d'autres paramètres environnementaux, dont certains sont traités dans cette thèse.

L'objectif principal de ce travail est de déterminer les paramètres contrôlant la biodisponibilité d'un polluant organique initialement présent sous une forme dissoute dans un milieu aqueux contenant des particules solides en suspension. Pour ce faire, notre choix s'est porté sur une molécule modèle, le naphthalène, hydrocarbure polyaromatique présent à l'état naturel dans les sols houillers les régions pétrolifères, et dégradé rapidement (quelques heures) par voie bactérienne en souche pure (Guerin et Boyd, 1992). Le devenir physico-chimique et biologique du naphthalène a été étudié dans des suspensions aqueuses en présence de quatre types de matériaux de complexité croissante : une argile (la montmorillonite sodique, matériau constitué de particules minérales de petite taille), deux argiles organiques possédant chacune une capacité de rétention du polluant différente (un complexe montmorillonite/polyacrylamide et une argile organique B34 contenant un tensioactif), et un matériau naturel (un sédiment de rivière).

Ce document s'organise en sept chapitres. Après l'introduction générale posant la

problématique de la limitation de la biodisponibilité, une analyse bibliographique constitue le second chapitre. Elle tente, à travers une revue critique de la littérature, de définir la biodisponibilité d'un polluant organique vis-à-vis de microorganismes, et d'en analyser les mécanismes qui la contrôlent. Le chapitre 3 présente le matériel, les méthodes analytiques et les outils de calcul qui ont été utilisés pour les différentes expérimentations. Les chapitres 4, 5 et 6 regroupent, quant à eux, les résultats. Les résultats exposés dans le chapitre 4, intitulé "interactions du naphthalène avec des particules argileuses en milieux aqueux" constituent la première phase du travail. Cette première phase a consisté en l'étude du "comportement" des molécules de naphthalène sous forme solubilisée mises en contact avec des particules en suspension (argiles et sédiment) dans des conditions abiotiques. Le chapitre 5 "biodégradation du naphthalène en présence de suspensions argileuses" a permis d'apprécier les modifications des cinétiques de biodégradation du naphthalène par une souche bactérienne pure, *Burkholderia cepacia*, en présence des suspensions de particules solides précédemment étudiées au chapitre 4. Le chapitre 6 regroupe les résultats et une réflexion qui ont permis d'identifier les différents paramètres modifiant la biodisponibilité du naphthalène en présence de matériau solide, adsorbant ou non. Enfin, le chapitre 7 rassemble les conclusions générales.

Références bibliographiques

- FETTER C.W., 1993,
Transformation, retardation and attenuation of solutes, Chapter three,
in Contaminant hydrogeology, Maxwell Publishing Company, New York, 115-162.
- FU M.H., H. MAYTON and M. ALEXANDER, 1994,
Desorption and biodegradation of sorbed styrene in soil and aquifer solids,
Environ. Toxicol. Chem., **13**, 749-753.
- GORDON A.S. and J.F. MILLERO, 1985,
Adsorption mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds,
Microb. Ecol., **11**, 289-298.
- GUERIN W.F. and S.A. BOYD, 1992,
Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species,
Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1142-1152.
- KUKKONEN J. and A. OIKARI, 1991,
Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material,
Wat. Res., **25**, 455-463.
- MIHELICIC J.R. and R.G. LUTHY, 1991,
Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions,
Environ. Sci. Technol., **25**, 169-177.
- OGRAM A.V., R.E. JESSUP, L.T. OU and P.S.C. RAO, 1985,
Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils,

Appl. Environ. Microbiol., 49, 582-587.

SAMUELSSON M.O. and D. L. KIRCHMAN, 1990,
Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface hydrophobicity,
Appl. Environ. Microbiol., 26, 2643-2648.

SCHWARZENBACH R.P., P.H. GSCHWEND and D.M. IMBODEN (eds), 1993,
Environmental organic chemistry,
John Wiley & Sons inc., New York.

SCOW K.M. and M. ALEXANDER, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : experimental results with synthetic aggregates,
Soil Sci. Soc. Am. J., 56, 128-134.

SCOW K.M. and J. HUTSON, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : theoretical considerations,
Soil Sci. Soc. Am. J., 56, 119-127.

WEBER J.B. and H.D. COBLE, 1968,
Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays,
J. Agri. Food Chem., 16, 475-478.

CHAPITRE 2

ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 2. Analyse bibliographique : Biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement.....	7
2.1. Introduction.....	7
2.2. Biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement.....	8
2.2.1. Estimation de la biodisponibilité d'un polluant organique.....	8
2.2.2. Observations de la modification de la biodisponibilité.....	9
2.2.3. Artefacts et biais.....	14
2.2.3.1. Effet du temps de séjour.....	14
2.2.3.2. Etudes de terrain.....	15
2.2.3.3. Transformations abiotiques.....	16
2.3. Mécanismes limitant la biodisponibilité.....	16
2.3.1. Immobilisation des microorganismes.....	16
2.3.2. Immobilisation du contaminant.....	18
2.3.2.1. Accumulation à la surface.....	18
2.3.2.2. Transfert de masse.....	21
2.3.2.2.1. Transfert de masse externe.....	21
2.3.2.2.2. Transfert de masse interne.....	22
2.4. Modélisation des mécanismes limitant la biodisponibilité.....	23
2.4.1. k_p et sorption.....	23
2.4.1.1. Cinétiques de sorption.....	24
2.4.1.2. Cinétiques d'adsorption prenant en compte la diffusion.....	26
2.4.1.3. Isothermes.....	28
2.4.1.4. Les QSARS.....	29
2.4.2. Modèles intégrant sorption et biodégradation.....	31
2.4.3. Sorption / transfert de masse / biodégradation.....	34
2.4.4. Les nombres adimensionnels.....	37
2.5. Conclusions et perspectives.....	38

Chapitre 2. Analyse bibliographique : Biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement

2.1. Introduction

Cette analyse bibliographique s'inscrit dans le cadre général de la biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement, et fait l'objet d'une revue critique soumise à publication dans *Critical Review in Environmental Science and Technology*. Elle a pour objectif d'étudier pourquoi un grand nombre d'études de laboratoire réalisées dans un but de reproduire le plus fidèlement possible les hydrosystèmes naturels (rivières, lacs) et les sols, montre que les taux de biodégradation des xénobiotiques sont plus faibles que ceux mesurés dans des tests de biodégradation classiques (cultures en batchs ou chemostats de suspensions bactériennes en milieu liquide en l'absence de particules).

Depuis ces quelques dernières années, la pollution par les composés organiques des environnements naturels, eaux de surfaces et souterraines, sols et sédiments est devenue un problème majeur et médiatique. Il existe actuellement des procédés de dépollution par voie physico-chimique, thermique, et biologique. Les procédés biologiques qui mettent en oeuvre la capacité des microorganismes à consommer la pollution, présentent l'avantage, dans la plupart des cas, de transformer les xénobiotiques en composés généralement non polluants, entre autre, eau, dioxyde de carbone, biomasse (dans certaines situations toutefois, les métabolites sont toxiques). Augmenter l'activité des microorganismes est donc un moyen pour nettoyer un environnement pollué. Mais pour une décontamination biologique efficace, certaines conditions doivent être réunies, telles que la présence et l'activité des microorganismes, la présence d'éléments de croissance et surtout l'accessibilité du polluant à ces microorganismes dégradeurs.

La littérature ne donne pas de définition de la biodisponibilité. Elle ne se mesure pas et est estimée de façon indirecte à travers des comparaisons de cinétiques de biodégradation. La biodisponibilité s'exprime de façon relative par une augmentation ou une diminution de la biodégradation par rapport à une valeur témoin.

L'objectif de cette étude est d'analyser pourquoi un xénobiotique dégradé par des microorganismes dans un test classique de biodégradation (*i.e.* en l'absence de matériau particulaire), offre une résistance à la dégradation en présence de particules (minérales ou organiques), ou en présence de phases liquides non aqueuses (non Aqueous Phase liquids en anglais, NAPLs). Cette résistance se traduit non seulement par des cinétiques plus lentes mais aussi par des quantités dégradées plus faibles. L'étude s'organise en quatre parties. La première partie recense, à travers une littérature très variée, les méthodes employées pour apprécier la biodisponibilité d'un xénobiotique et les modifications observées au niveau de la biodégradation.

La seconde partie détaille les mécanismes mis en cause dans la limitation de la biodisponibilité, tant d'un point de vue des microorganismes que celui du polluant (rétention, diffusion). La troisième partie est consacrée aux modèles développés et utilisés dans un but d'identifier le mécanisme limitant ou dans un but prédictif. Enfin, ce chapitre s'achève par une conclusion et un développement sur les perspectives et les moyens pouvant être mis en oeuvre pour augmenter la biodisponibilité d'un polluant présent dans un environnement naturel.

2.2. Biodisponibilité des polluants organiques dans l'environnement

2.2.1. Estimation de la biodisponibilité d'un polluant organique

La quantification de la modification de la biodisponibilité d'un xénobiotique ne peut être réalisée qu'au moyen de tests de laboratoire, eu égard à la multiplicité des paramètres contrôlant les cinétiques de terrain. Les conditions d'étude rencontrées dans la littérature sont évidemment très diversifiées quant aux choix du xénobiotique, des microorganismes, des systèmes de mesure de la biodégradation, des milieux utilisés (suspensions de sols, sédiments, argile, milieux solides...). La plupart des études sont effectuées dans des systèmes fermés (batch) et sans apport extérieur durant tout le test. Quelques travaux sont également réalisés en colonne, système dynamique, dont le but est de mimer un écoulement dans un système poreux.

La modification de la biodisponibilité est estimée par la modification du taux de biodégradation du xénobiotique lors d'ajout de substances (particules, phase organique) dans le système. La diversité des substances utilisées, ainsi que la diversité des xénobiotiques testés rendent les comparaisons entre expérimentations difficiles, parfois impossibles. Ainsi, sans prendre en compte la biodisponibilité des xénobiotiques non dissous (cristaux) (Kefford *et al.*, 1972; Stucki et Alexander, 1987; Thiem, 1994; Thomas *et al.*, 1986; Thomas et Alexander, 1986; Volkering *et al.*, 1993; Wodinski et Bertolini, 1972), des études de biodisponibilité ont été effectuées sur une gamme très large de produits organiques allant du pesticide (Ogram *et al.*, 1985; Rijnaarts *et al.*, 1990; Stevens *et al.*, 1990) à l'hydrocarbure (AlBashir *et al.*, 1990; Aronstein *et al.*, 1991; Guerin et Boyd, 1992; Zhang *et al.*, 1995) en passant par les protéines ou acides aminés (Dashman et Stotsky, 1986) ou encore avec un substrat facilement assimilable tel que le glucose ou les amines (Wsolek et Alexander, 1979).

Les particules employées sont souvent des particules d'argile, considérées comme de bons adsorbants parce que leur grande surface spécifique et leur capacité d'échange cationique leur confère à priori des propriétés de rétention du polluant (Dashman et Stotsky, 1986; Kunc et Stotsky, 1977; Miller et Alexander, 1991; Subba Rao et Alexander, 1982; Weber et Coble, 1968; Wszolek et Alexander, 1979). Afin de reproduire au mieux l'environnement, les tests sont aussi

réalisés avec des sols (Guerin et Boyd, 1992; Laha et Luthy, 1991; 1992; Mihelcic et Luthy, 1991; Rijnaarts *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1990) et les sédiments (Fu *et al.*, 1994; Landrum *et al.*, 1992; Parsons, 1992). Cependant, l'utilisation de ces matériaux complexes souvent mal définis rend difficile l'interprétation des résultats. C'est pourquoi, pour des études mécanistiques, certains auteurs ont préféré travailler avec des matériaux artificiels tels que les billes de verre (Samuelsson et Kirchman, 1990), des particules de téflon (Harms et Zehnder, 1994; 1995), des billes de silice (Ramaswami *et al.*, 1994) ou encore des billes utilisées pour la chromatographie d'exclusion de gel (Scow et Alexander, 1992).

La différenciation dans la mise en oeuvre des tests, outre les matériaux utilisés (xénobiotiques et particules) se fait aussi dans la quantité de matériau présent. Ainsi, trois dénominations peuvent être rencontrées : "suspension", quand la concentration particulaire est inférieure à quelques centaines de grammes par litre, "slurry" pouvant être traduit par boue, pour des concentrations de l'ordre de 500gL^{-1} et enfin "sol" quand la masse de solide est supérieure à la masse d'eau.

2.2.2. Observations de la modification de la biodisponibilité

La présence de matériaux solides (§2.2.1) ou même de substances organiques liquides (NAPLs), modifie le comportement des polluants organiques vis-à-vis de la biodégradation tant du point de vue des cinétiques que des quantités biodégradées. Trois comportements différents peuvent être observés : (1) augmentation de la biodégradation, (2) diminution de la biodégradation ou (3) aucune influence.

La majorité des exemples relatés dans la littérature montrent que les cinétiques de biodégradation sont réduites en présence de particules. Très peu d'exemples suggèrent une augmentation de la biodégradation en un nombre encore plus restreint ne suggère pas d'influence de la présence de particules.

Nous citerons ici trois exemples, tous critiquables d'un point de vue expérimental, montrant une stimulation de la biodégradation d'un xénobiotique en présence de particules.

En 1977, Kunc et Stotsky, et plus tard Shimp et Young (1988), ont montré que la décomposition de la vanilline (mesurée par la production de CO_2 et par la consommation d' O_2) augmentait quand la quantité de solide ajouté au système (montmorillonite) augmentait (Figure 2.1).

Malgré l'absence de contrôle bactériologique sur la montmorillonite, les auteurs ont expliqué ces résultats par un apport de microorganismes dégradeurs en même temps que la montmorillonite.

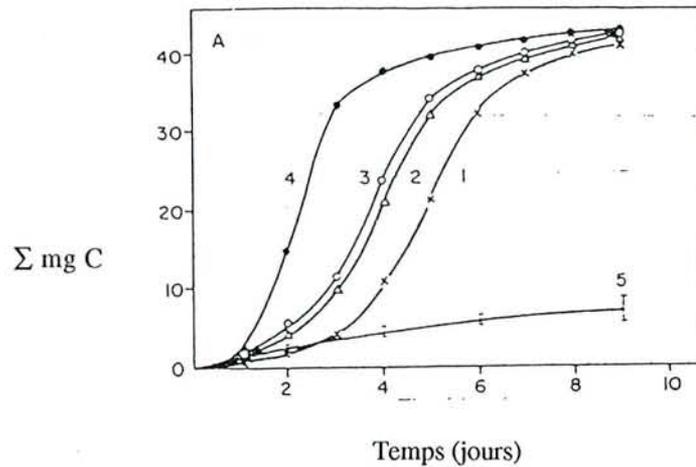


Figure 2.1. Effet de la montmorillonite sur l'oxydation de la vanilline en présence de montmorillonite exprimé en CO₂ produit. 1 = contrôle sans montmorillonite, 2 = 5% , 3 = 10% ; 4 = 20% de montmorillonite, 5 = contrôle montmorillonite sans vanilline (d'après Kunc et Stotsky, 1977)

S'affranchissant de ce paramètre inoculum en vérifiant que le même nombre de microorganismes dégradateurs ont été initialement introduits dans chaque réacteur, Laha et Luthy (1991) ont également constaté un pourcentage de phénanthrène minéralisé plus important en présence de sol qu'en son absence (Figure 2.2).

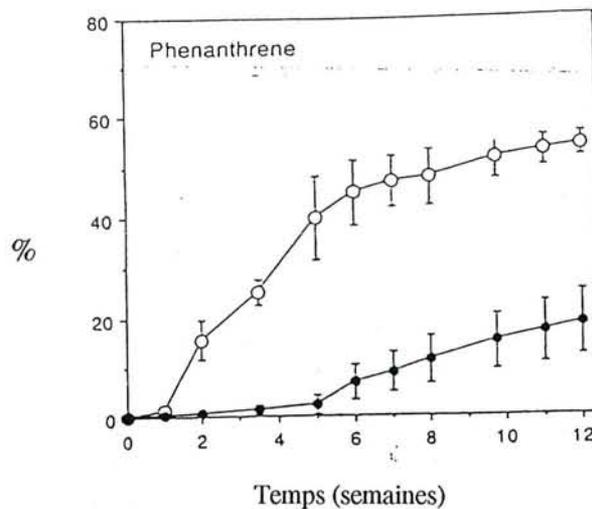


Figure 2.2. Comparaison du pourcentage de phénanthrène minéralisé dans de l'eau (●) et dans un système composé de sol et d'eau (○) (1:8g/mL). Chaque système a reçu le même inoculum capable de dégrader le phénanthrène (d'après Laha et Luthy, 1991)

Laha et Luthy (1991) expliquent cette augmentation par une meilleure disponibilité du phénanthrène à partir du sol qu'à partir de l'hydrocarbure présent sous forme de cristaux (nécessité

d'une dissolution). En absence de sol, la minéralisation est limitée par la vitesse de dissolution du substrat sous forme cristalline. Une critique peut par contre être formulée selon laquelle ces auteurs n'ont pas vérifié que le sol pouvait apporter des éléments nutritifs en quantité limitante dans le système sans sol ou des co-substrats, permettant d'augmenter la minéralisation de l'hydrocarbure.

Malgré ces exemples, un large consensus semble s'établir sur le fait que l'apport de particules, minérales ou organiques, diminue la biodégradation des composés organiques tant d'un point de vue quantité biodégradée mesurée à un temps t (Gordon et Millero, 1985; Manilal et Alexander, 1991; Samuelsson et Kirchman, 1990; Weber et Coble, 1968; Wzolek et Alexander, 1979) que d'un point de vue des cinétiques de biodégradation (vitesses initiales par exemple) (Guerin et Boyd, 1992; Parsons 1992; Subba Rao et Alexander, 1982).

L'exemple choisi ici pour illustrer la diminution de la quantité de xénobiotique biodégradé en présence de particules est emprunté à Weber et Coble (1968). Ces auteurs ont constaté une diminution de la quantité de diquat dégradée, proportionnelle à la quantité de montmorillonite présente dans le milieu. Pour 7,4 μ moles de diquat, 10 mg de montmorillonite (diminution de moitié de la concentration en solution) inhibent d'un facteur 2 la production de CO_2 en 4 semaines et 20 mg de montmorillonite (la concentration en solution devient nulle) inhibent totalement la production de CO_2 . Des "contrôles" attestent que le diquat n'est pas soumis à une minéralisation d'origine abiotique, suggérant une limitation de la biodisponibilité du diquat par sa rétention sur l'argile.

Le deuxième exemple cité ici montre une diminution des cinétiques de biodégradation du naphthalène en présence de sol (Guerin et Boyd, 1992). Les essais de biodégradation ont été réalisés en réacteurs batchs à l'aide d'une souche pure adaptée à l'hydrocarbure avec des ajouts de sol (5,36% carbone organique) à différentes concentrations. La figure 2.3 et le tableau 2.1 montrent qu'une concentration croissante en sol diminue à la fois la vitesse initiale de biodégradation et le pourcentage de naphthalène minéralisé après 300 minutes.

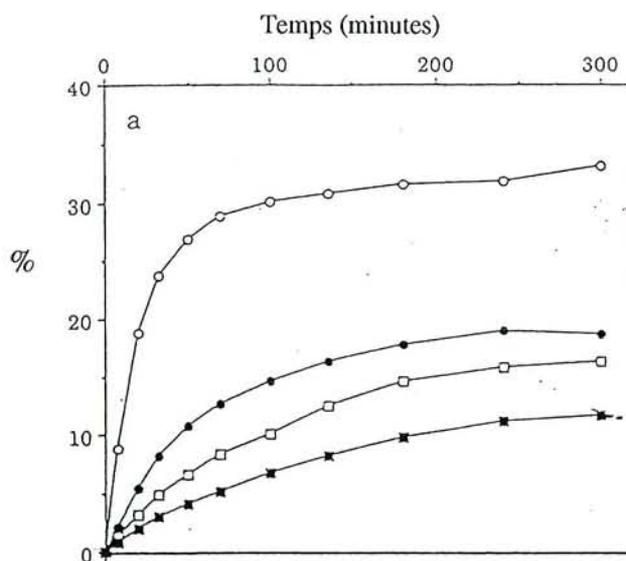


Figure 2.3. Naphthalène minéralisé (%) par une souche pure en présence de sol. (○) témoin sans sol, (●) 66,7 g L⁻¹ (□) 133,3 g L⁻¹ et (■) 200 g L⁻¹ de sol (d'après Guerin et Boyd, 1992)

Tableau 2.1. Vitesses de dégradation du naphtalène et pourcentages massiques minéralisés (premier ordre x concentration initiale) (d'après Guerin et Boyd, 1992)

Sol (g L ⁻¹)	% minéralisé (t = 300 min)	Vitesse de biodégradation (ng mL ⁻¹ min ⁻¹)
0	31	1,02
66,7	19	0,23
133,3	17	0,12
200	13	0,08

Une critique peut toutefois être émise ici; les conclusions des auteurs ne sont jamais à cent pourcents justifiées car des questions de constitution de milieu nutritif, de dissolution du polluant, de la nature de la sorption (dans le cas de l'exemple de Guerin et Boyd) ne sont jamais soulevées.

Ces deux exemples sont empruntés à des expériences démontrant que l'ajout de particules modifie la biodisponibilité d'un xénobiotique. Il existe d'autres exemples où la biodisponibilité est modifiée lorsque le xénobiotique côtoie une autre phase liquide non aqueuse (NAPL). Les NAPLs présentes dans les sols sont généralement des résidus de l'industrie du pétrole, du charbon. Ce sont des phases organiques qui se trouvent sous forme de gouttelettes, ou qui saturent les pores des particules. La présence des NAPLs constitue une contamination à long terme des eaux souterraines par relargage des composants de la phase organique.

Ramaswami et Luthy (1992) et Ramaswami *et al.* (1994) ont expérimenté un système de billes de silice dont les pores, saturés en NAPL, ne permettent pas l'accès aux microorganismes (Figure 2.4).

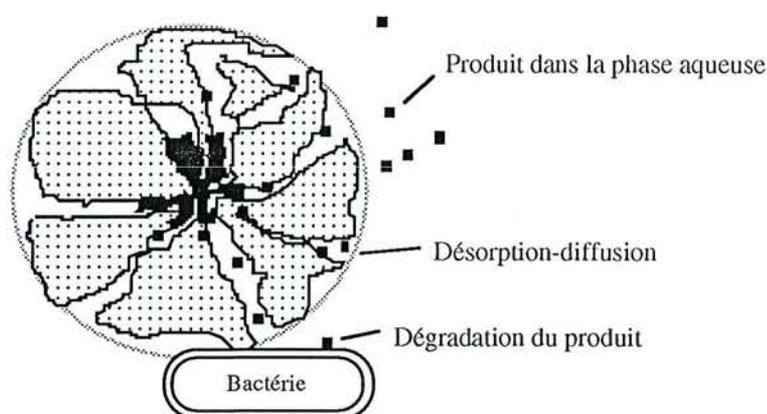


Figure 2.4. Schéma d'une particule poreuse contenant du composé chimique absorbé dans les pores et diffusant vers l'extérieur pour être dégradé (adapté de Ramaswami *et al.*, 1994)

Ces auteurs se sont intéressés à la minéralisation du naphtalène présent dans la phase organique dans les pores et à concentration de saturation dans la phase eau.

Après introduction des microorganismes dégradeurs, ils ont observé une minéralisation

initialement "rapide" qui devient plus lente après quelques jours (Figure 2.5). La première phase "rapide" peut être attribuée à une dégradation du naphthalène en solution donc immédiatement accessible (concentration initiale = concentration de saturation dans l'eau). La minéralisation est ensuite limitée par le partage du naphthalène entre la phase organique (NAPL) et l'eau.

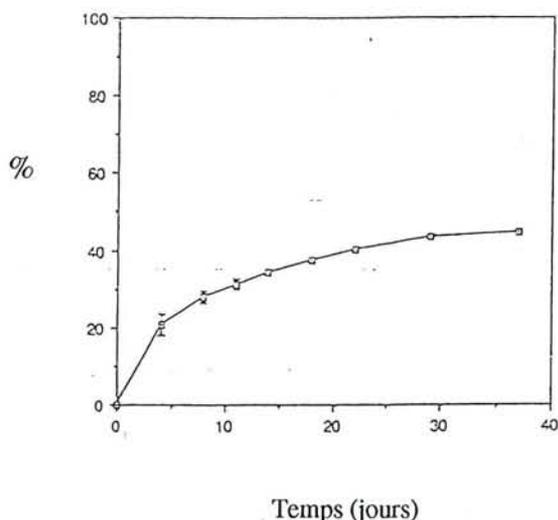


Figure 2.5. Minéralisation du naphthalène (%) présent à concentration de saturation dans des billes de silice microporeuses (d'après Ramaswami et Luthy, 1994)

Avec le même hydrocarbure (naphthalène), Ortega-Calvo et Alexander (1994) ont décrit un comportement différent face à la dégradation quand l'hydrocarbure est dissous dans du di(2-ethylhexyl)phtalate, une autre phase organique présente sous forme de gouttelettes dans l'eau. La minéralisation du naphthalène par *Arthrobacter sp.* est initialement lente (30-40 heures) puis augmente (Figure 2.6).

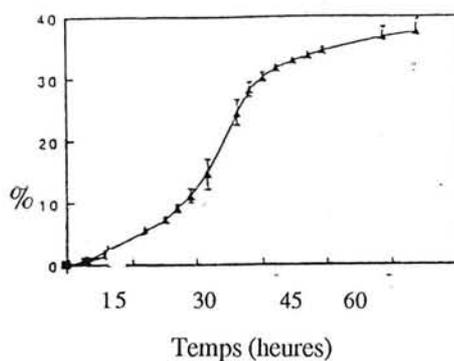


Figure 2.6. Minéralisation par *Arthrobacter sp.* du naphthalène dissous dans une phase organique (d'après Ortega-Calvo et Alexander, 1994)

Dans les expériences d'Ortega-Calvo et Alexander (1994), le naphthalène est "directement" en contact avec les microorganismes présents à l'interface des gouttelettes du di(2-ethylhexyl)phtalate (réservoir de substrat) et de l'eau. Par contre, dans le cas expérimental de Ramaswami et Luthy (1994), les microorganismes se situent à l'extérieur des particules poreuses qui contiennent le substrat. Plusieurs mécanismes sont alors responsables de la limitation de la

biodisponibilité du naphthalène : dissolution de la phase organique dans la phase aqueuse et désorption, puis diffusion dans les pores. Ces deux exemples montrent combien la notion de proximité des microorganismes avec les molécules de substrat est importante.

2.2.3. Artefacts et biais

Ce paragraphe est consacré aux artefacts et biais qui peuvent intervenir lors de transpositions d'expériences de laboratoire au terrain. Certains facteurs tels que le vieillissement sur système sol, les transformations abiotiques peuvent conduire à des résultats de terrain différents de ceux obtenus en laboratoire.

2.2.3.1. Effet du temps de séjour

Plusieurs publications scientifiques suggèrent que lorsque le temps de séjour d'un polluant dans un sol augmente, sa biodisponibilité est diminuée et sa persistance augmente. Ce phénomène est traduit dans la littérature sous le terme de "aging" ou encore "weathering".

Il a été constaté que la simazine, fraîchement ajoutée à un sol est disponible à la dégradation, tandis que la simazine retrouvée dans un sol amendé chaque année depuis 20 ans devient totalement indisponible à la fois vis-à-vis des microorganismes mais aussi de végétaux (canne à sucre). Ces essais de minéralisation de la simazine soulèvent le problème des expériences de laboratoire qui peuvent surestimer un potentiel de dégradation d'un sol (Scribner *et al.* 1992).

Le vieillissement est un phénomène qui a été observé non seulement avec des pesticides, mais aussi avec des hydrocarbures polyaromatiques tels que le pyrène ou le phénanthrène (Landrum *et al.*, 1992).

Il semblerait d'ailleurs, selon Fu *et al.* (1994) que ce phénomène de diminution de la biodisponibilité soit directement corrélé à la fraction extractible par voie chimique. Ces auteurs ont constaté que l'augmentation du temps de contact (de 0 à 123 jours) du styrène avec un sol stérilisé diminue la fraction de styrène extractible à l'acétonitrile (Tableau 2.3) mais aussi le pourcentage de styrène minéralisé (Figure 2.7).

Ces résultats s'expliquent par une lente diffusion du styrène dans les particules de sol mais également par une modification ou réorganisation de la matrice, entraînant une sorption du plus en plus forte du styrène.

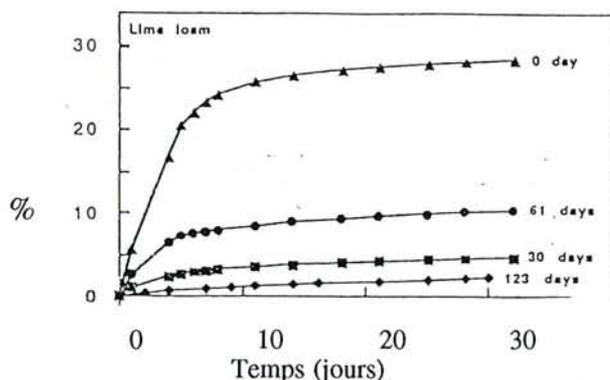


Figure 2.7. Pourcentage de styrène biodégradé pour différents temps d'exposition du styrène avec le sol stérile avant inoculation (d'après Fu *et al.*, 1994)

Tableau 2.3. Pourcentages de styrène extrait en ^{14}C par l'acétonitrile (d'après Fu *et al.*, 1994)

Temps (jours)	% extrait
0	90,8
30	6,62
61	24,9
123	1,25

Les résidus facilement extractibles sont fixés au sol par des liaisons de faible énergie (Bertin et Schiavon, 1989). Par contre, les résidus non extractibles doivent contracter des liaisons plus fortes, comme des liaisons de covalence, ou bien sont emprisonnés au sein d'un réseau tridimensionnel des macromolécules humiques (Schiavon *et al.*, 1977).

2.2.3.2. Etudes de terrain

La prudence s'impose quand il s'agit de transposer des résultats de biodisponibilité mesurés en laboratoire au milieu naturel. En sus des effets du vieillissement (§2.2.3.1), il ne faut pas négliger les facteurs environnementaux. Contrairement aux conditions de laboratoire, il est rare que les conditions les plus favorables à la biodégradation soient réunies dans les milieux naturels. Des paramètres tels que le pH du sol, la température (Zhang *et al.*, 1995), la présence d'oxygène ou plus généralement d'accepteurs d'électrons (Bouwer et Zehnder, 1993; Cobb et Bouwer, 1991; Thomas et Ward, 1989), les éléments minéraux qui ne sont pas en concentration optimale (Manilal et Alexander, 1991) ou encore la toxicité due à la présence de métaux ou autres toxiques (Manilal et Alexander, 1991) ne sont pas à négliger.

De plus, les microorganismes doivent être capables de dégrader le xénobiotique et être en nombre suffisant pour une élimination efficace du polluant (Durant *et al.*, 1995; Holm *et al.*, 1992; Stevens *et al.*, 1990).

Enfin, de simples témoins abiotiques, ou d'activité endogène, facilement réalisables dans les expériences de laboratoire sont difficilement concevables lorsque des mesures sont réalisées sur le terrain. Des essais *in situ* nécessitent l'emploi d'appareillages souvent complexes de manipulation et d'interprétation, tels que des systèmes de colonne utilisés pour comparer la capacité de dégradation d'un microcosme dans un milieu liquide et dans un sédiment (Holm *et al.*, 1992).

2.2.3.3. Transformations abiotiques

Dans une optique de bioremédiation, l'élimination d'un polluant dans un environnement naturel (sol, sédiment, eau de surface) peut être favorisée par des transformations abiotiques dont l'importance n'est parfois pas négligeable.

Pour citer quelques exemples, un phénol peut être oxydé rapidement (en moins de 2 heures) dans une suspension d'oxydes de manganèse (Ukrainczyk et McBride, 1992), ou bien encore la réduction microbiologique de l'hexachloroéthane est suivie d'une réduction partielle par des mécanismes de radicaux libres entraînant de ce fait une deshydrohalogénéation du composé (Roberts et Gschwend, 1994).

Ces transformations abiotiques utiles dans l'environnement peuvent être la cause de fausses interprétations lors d'études en laboratoire et conduire à des conclusions erronées si le nombre de témoins n'est pas suffisant.

2.3. Mécanismes limitant la biodisponibilité

Les mécanismes de limitation de la biodisponibilité des molécules organiques sont décrits dans cette partie du point de vue des deux principaux acteurs, celui des microorganismes et celui du polluant.

2.3.1. **Immobilisation des microorganismes**

Dans l'environnement, les microorganismes sont rarement libres et se trouvent souvent associés à des particules minérales et/ou organiques. C'est pourquoi un sol apparaît comme un ensemble de sites hétérogènes abritant des populations différentes de microorganismes, bactéries (10^8 à 10^9 bactéries/g de sol sec), champignons, algues, protozoaires (10^4 à 10^6 organismes/g de sol) (Berthelin *et al.*, 1994), qui ont tendance à former des agrégats ou des colonies comme le permet de distinguer la figure 2.8.

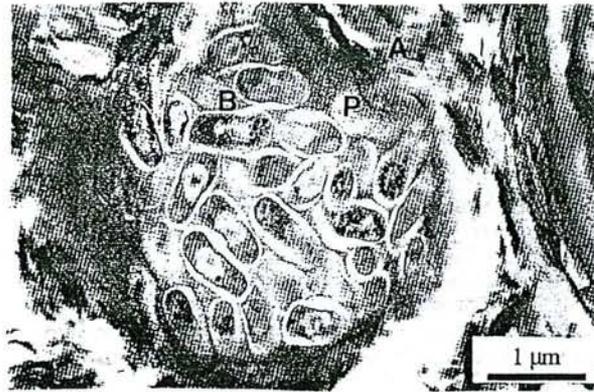


Figure 2.8. Observations en microscopie électronique à transmission de colonies bactériennes localisées sur des résidus organiques et minéraux; B : bactéries, P : polymères, A : argiles (d'après Chotte *et al.*, 1992).

La présence de surfaces (particules solides ou phases liquides non aqueuses (NAPLs)), semble modifier l'activité biologique des microorganismes ou de leurs enzymes. En effet, les propriétés d'hydrophobicité de la paroi bactérienne autorisent la fixation et l'adhésion des cellules. La production d'exopolymères par les bactéries modifie les échanges entre la cellule et le milieu extérieur et réduit sa mobilité. Malgré l'impossibilité d'établir un consensus sur un effet positif ou négatif de la présence de surfaces sur les bactéries, bon nombre d'études montrent une augmentation de l'activité bactérienne lorsque les microorganismes sont fixés. L'influence de la fixation/adhésion des microorganismes sur leur activité ne fait pas l'objet de cette étude et a été largement revue par plusieurs auteurs (Marshall, 1980; Marshall et Bitton, 1980; Savage et Fletcher, 1985; Van Loosdrecht *et al.*, 1990).

L'activité microbienne d'un sol est partiellement due à des enzymes extracellulaires. Ces enzymes jouent un rôle important dans le processus de dégradation par leur capacité à attaquer de grosses molécules dont la taille ne leur permet pas d'être adsorbée par les cellules (Price et Morel, 1990). Ces enzymes se trouvent de façon prédominante sous forme adsorbée (Burns, 1980; Quiquampoix *et al.*, 1993 ; Quiquampoix, 1995). Elle sont retenues par des interactions électrostatiques avec les minéraux argileux dont les capacités adsorptives sont importantes (quelques grammes d'enzymes par gramme d'argile) (Meyer-Reil, 1991 ; Staunton et Quiquampoix, 1994) ou bien forment des complexes avec des substances humiques (Burns, 1990). Leur piégeage les empêche d'évoluer dans le milieu naturel, et leur activité catabolique est directement diminuée (Quiquampoix, 1987a, b ; Quiquampoix *et al.*, 1989 ; Staunton et Quiquampoix, 1994). La sorption d'enzymes est une cause directe de la diminution de la biodégradation d'un composé organique dans un sol.

2.3.2. Immobilisation du contaminant

2.3.2.1. Accumulation à la surface

L'adsorption d'une molécule chimique sur une surface dépend de la nature de la molécule et de la surface. Elle est aussi dépendante de facteurs physico-chimiques du milieu tels que pH, force ionique du milieu, type et quantité d'ions présents, présence de matière organique, température (Gennari *et al.*, 1994). L'adsorption résulte de mécanismes chimiques ou physiques et il est possible de différencier 4 types de mécanismes de sorption : l'échange d'ions, la formation de complexes, les interactions hydrophobes et la précipitation de surface.

(i) L'échange d'ions

L'échange d'ions, anion ou cation, est un remplacement d'un ion de surface par un autre ion de même signe possédant une affinité plus grande. Dans les milieux naturels, il est souvent lié à la présence de minéraux argileux possédant des charges négatives saturées par Na, Ca...

Un exemple classique est celui de l'échange du potassium par du calcium qui peut s'écrire selon le formalisme suivant :



Ce sont des interactions électrostatiques qui gèrent la formation d'échanges d'ions, encore nommés complexes de sphère externe, le cation ou l'anion restant entouré de molécules d'eau (Sigg *et al.*, 1992).

(ii) La formation de complexes

La formation de complexe peut être illustrée à titre d'exemple par l'adsorption spécifique d'un acide gras à la surface de l'oxyde d'aluminium. Les groupes carboxyles par échange de ligands remplacent les groupes -OH de surface de Al_2O_3 (Ulrich *et al.* 1988).

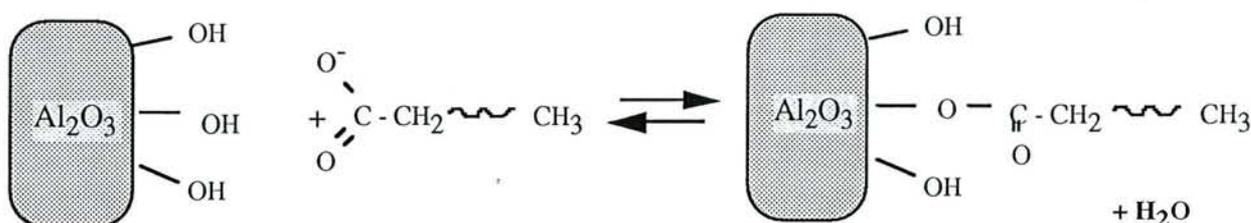


Figure 2.9. Formation d'un complexe avec un acide gras et un oxyde métallique

Ces liaisons se produisent essentiellement avec des oxydes métalliques, très présents dans

les eaux naturelles et les sols, qui possèdent des groupements -OH de surface. Il y a mise en commun d'un électron entre un donneur et un accepteur (par exemple, un métal). Il y a alors échange de protons et cations (Sigg *et al.*, 1992).

(iii) L'effet hydrophobe

Les interactions hydrophobes interviennent entre composés hydrophobes, non polaires, électriquement neutres (Fetter, 1993), généralement faiblement solubles dans l'eau (Schwarzenbach *et al.*, 1993), comme les hydrocarbures qui ont tendance à maintenir le plus faible contact avec l'eau.

L'attraction hydrophobe ne repose pas sur une affinité spéciale de groupes non polaires entre eux, mais sur des forces d'attraction entre les molécules d'eau qui doivent être surmontées (Sigg *et al.*, 1992).

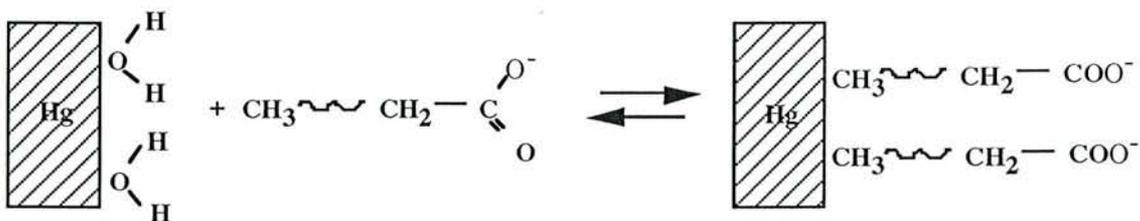


Figure 2.10. Interactions hydrophobes entre une chaîne d'hydrocarbure et une surface de mercure (d'après Ulrich *et al.*, 1988)

A la surface du mercure non polaire, l'interaction hydrophobe entre une chaîne d'hydrocarbures et la phase aqueuse conduit à un déplacement direct des molécules d'eau contiguës au mercure et à l'adsorption d'acides gras à la surface d'Hg (Ulrich *et al.*, 1988).

(iv) La précipitation de surface

La précipitation de surface consiste en la formation d'un précipité de soluté à la surface (limite de solubilité non atteinte), suite à une adsorption multicouche, sans précipitation dans la phase aqueuse. La précipitation de surface est une réaction qui a lieu avec des métaux lourds sur des surfaces telles que les oxydes métalliques (oxydes de magnésium) (Fendorf *et al.*, 1992), ou avec des molécules organiques qui cristallisent ou bien sous des conditions hautement alcalines qui favorisent la dissolution de l'oxyde (Adu-Wsu et Wilcox, 1991).

Il est parfois difficile de distinguer ces quatre mécanismes (échange d'ions, formation de complexes, interactions hydrophobes ou précipitation de surface) quand la rétention du polluant est

étudiée avec des matériaux complexes comme les sols et les sédiments qui comportent de la matière organique avec une certaine hydrophobicité, des sites échangeurs d'ions (minéraux argileux), des oxydes métalliques (Tableau 2.2). Il semble également difficile d'établir une relation directe entre la nature de la liaison qui retient le polluant en surface et sa disponibilité vis-à-vis des microorganismes. Un consensus semble toutefois s'établir sur le fait qu'un composé adsorbé n'est pas disponible : il doit être en solution pour être soumis à une attaque bactérienne (Tableau 2.2).

Tableau 2.2. Diminution de la biodisponibilité par adsorption du polluant

Liaison (s)	Composé(s)	Surface(s) ou adsorbant(s)	Explication(s) de la diminution de la biodisponibilité	Références
H?	Protéine algale	Verre (Hi) Polyéthylène (H)	Adsorption sur Hi < Adsorption H Dégradation initiale Hi > H H : Energie liaison la plus forte	Samuelsson et Kirchman (1990)
H?	Toluène	Sol	Désorption contrôle la biodégradation	Robinson <i>et al.</i> (1990)
H?	Naphtalène	Sol	Désorption nécessaire et différente en fonction de la bactérie utilisée	Guerin et Boyd (1992)
H?	Naphtalène	Sol	Diffusion intraparticulaire limitante	Mihelcic et Luthy (1991)
H?	Naphtalène	Sol	Limitation par la désorption fortement irréversible	Al Bashir <i>et al.</i> (1990)
H?	Naphtalène	Sol	Désorption lente + transfert de masse limitant	Zhang <i>et al.</i> (1995)
C Covalence	Phénol Aniline	Sol	Désorption + Diffusion	Scow et Alexander (1986)
C	Chlorocatéchol	Sed	Covalence = non minéralisé	Allard <i>et al.</i> (1994)
C	Glucose Acides orga	Hydroxyapatite	Désorption ?	Gordon and Millero (1985)
I	Benzylamine	Argile	Adsorption = \propto C en solution Présence d'ions échangeables	Miller et Alexander (1991)
I	Benzylamine	Argile	Désorption limitante	Subba Rao et Alexander (1982)
I	Alkylamines	Billes verre Bentonite	Compétition autres cations Désorption limitante	Wsolek et Alexander (1979)
I	Diquat Paraquat	Argiles	Valeurs non fiables pas de désorption = pas de minéralisation	Weber et Coble (1968)
I	Acides aminés	Argiles	Désorption	Dashman et Stotzy (1986)
C+H?	2,4-D	Sols	Désorption + Diffusion matrice?	Ogram <i>et al.</i> (1985)
C+H?	Tensio-actifs	Sol	Désorption	Knaebel <i>et al.</i> (1994)
C+H?	HC	DOM	Sorption	Kukkonen and Oikari (1991)
I+H	Phénol Tensio-actifs	Sed	Disponibilité Van der Waals > Disponibilité échange d'ions	Shimp et Young (1988)
?	Styrène	Sols	Désorption + "Aging"	Fu <i>et al.</i> (1994)
?	HC	Sed	"Aging" : consolidation de liaisons	Landrum <i>et al.</i> (1992)
?	dibenzo-p-dioxy	Sed	Désorption	Parsons (1992)
?	Chlorocyclohexane	Sols	Désorption non limitante Diffusion intraparticulaire	Rijnaarts <i>et al.</i> (1990)
?	Simazine	Sol	"Aging"	Scribner <i>et al.</i> (1992)
?	Surfactant	Sol	Association à des résidus = non disponible	Ward et Larson (1989)

H : Interaction hydrophobe ou surface hydrophobe

Hi : Surface hydrophile

C : Formation de complexes

I : Echange d'ions

DOM : Matière organique dissoute

? : Aucune information sur les liaisons possibles entre le substrat et le matériau

HC : hydrocarbures
Sed : Sédiments

En 1968, Weber and Coble ont montré que le diquat s'adsorbe sur des particules de montmorillonite par échange d'ions. La quantité de pesticide minéralisé est directement proportionnelle à la quantité de diquat en solution. Si la moitié du diquat est retenu par l'argile, seule l'autre moitié en solution sera minéralisée. Des contrôles effectués sur la montmorillonite en fin d'expérience, confirment que la fraction de pesticide adsorbée n'a pas été attaquée ni désorbée (adsorption irréversible).

A contrario, certains équilibres d'adsorption molécule/surface peuvent être déplacés (remise en solution de la molécule initialement adsorbée) lorsque la concentration en solution diminue (adsorption réversible). C'est le cas de nombreux contaminants qui repassent dans la phase eau quand la fraction initialement en solution est biodégradée.

La désorption peut alors être le paramètre limitant de la biodégradation (Subba Rao and Alexander, 1982), mais elle peut aussi être plus rapide que la minéralisation (Mihelcic and Luthy, 1991 ; Miller and Alexander, 1991, Rijnaarts *et al.*, 1990). Dans ce cas, la limitation de la biodisponibilité est souvent liée au transfert de masse, interne ou externe.

3.3.2.2. Transfert de masse

Deux transferts de masse sont distingués dans les milieux particuliers : le transfert de masse interne et le transfert de masse externe. L'un se produit à l'intérieur des pores de la particule (interne) et l'autre (externe) dans la phase liquide qui comprend la majorité des microorganismes généralement trop gros pour s'infiltrer dans les pores (Figure 2.4)

3.3.2.2.1. **Transfert de masse externe**

Le transfert de masse externe se produit à l'extérieur des pores. Il s'agit d'une diffusion à travers une couche limite hydrodynamique autour des particules (Schwarzenbach *et al.*, 1993). Ce phénomène de transport est gouverné par un gradient de concentration et son flux peut être calculé par une loi de Fick

$$\Phi = De \frac{Ca - Cs}{\delta}$$

Φ : flux de soluté à travers la couche limite

Ca : concentration dans l'eau

Cs : concentration à la surface du solide

δ : épaisseur de la couche limite

De : diffusivité ($m^2 s^{-1}$)

L'application de la loi de Fick implique que le transport ne se fasse que par diffusion et le gradient est assimilé à un gradient linéaire.

La diffusion externe est un processus rapide de l'ordre de quelques secondes. Il est aisé d'approximer cette échelle de temps τ à partir de la diffusivité D_e du composé dans l'eau

$$\tau = \frac{[\text{Épaisseur de la couche limite}]^2}{3 D_e}$$

Par exemple, pour une particule de sable, de taille moyenne de 200 μm , il est possible d'estimer une couche limite maximale de 200 μm , taille de la particule (Schwarzenbach *et al.*, 1993). Le temps maximal requis pour qu'une molécule ayant une diffusivité de $10^{-5} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ diffuse à travers la couche limite est alors de 20 secondes (Schwarzenbach *et al.*, 1993) : le transfert est très rapide. De plus, dans les systèmes dits turbulents, la résistance au transfert de masse externe diminue puisque l'épaisseur de la couche limite s'affine. Cette rapidité explique pourquoi le transfert de masse externe est très souvent négligé (Brusseau *et al.*, 1991 ; Mihelcic et Luthy, 1991 ; Wu et Gschwend, 1986).

3.3.2.2. Transfert de masse interne

Différentes terminologies sont rencontrées pour exprimer le transport d'un soluté à l'intérieur des pores : diffusion intraparticulaire, transfert de masse interne. Le polluant adsorbé ou séquestré dans les pores dans lesquels les microorganismes ne peuvent pas pénétrer, est inaccessible à la biodégradation. Il doit alors désorber, diffuser et se trouver dans la phase aqueuse pour être consommé (Figure 2.11).

Le transfert de masse interne est un mécanisme qui est extensivement étudié (Stapleton *et al.*, 1994 ; Ramaswami *et al.*, 1992 ; Brusseau *et al.*, 1991 ; Scow et Hudson, 1992 ; Scow et Alexander, 1992 ; Wu et Gschwend, 1986 ; Zhang *et al.*, 1995) et il est facile de trouver dans la littérature des exemples de limitation et de non-limitation de la biodégradation par la diffusion intraparticulaire.

Rijnaarts *et al.* (1990) ont constaté que, dans un système agité, la diffusion intraparticulaire dans une suspension de sol limitait la biodégradation de l' α -hexachlorocyclohexane.

Cependant, à l'aide d'un modèle couplant la biodégradation à la désorption/diffusion intraparticulaire, Mihelcic et Luthy (1991) ont montré que la désorption/diffusion du naphthalène était relativement rapide comparée à la biodégradation du naphthalène et ne pouvait donc être le facteur limitant.

Les résultats de ces deux équipes ont été repris par Chung *et al.* (1993) pour tenter

d'apprécier l'importance de la limitation par le transfert de masse. Ils ont calculé le module de Thiele Φ (§2.4.4) qui n'est autre que le rapport du taux de biodégradation sans particules sur le taux de diffusion interne, pour évaluer l'importance relative de la diffusion. Pour l'étude réalisée par Mihelcic et Luthy où la biodégradation du naphthalène a été déterminée rapide par rapport à la sorption/diffusion, un rapport de 3,5 est calculé entre biodégradation et diffusion ($\Phi = 3,5$). Par contre, Φ est estimé à $2,2 \cdot 10^4$ pour l'étude de Rijnaarts *et al.* (1990) où le taux de biodégradation de l' α -hexachlorocyclohexane est limité par la désorption/diffusion du pesticide dans le sol.

Ces quelques exemples illustrent que selon le système particules/substrat, la diffusion dans les pores peut représenter un mécanisme important dans la limitation de la biodisponibilité d'un polluant.

2.4. Modélisation des mécanismes limitant la biodisponibilité

Ce paragraphe est consacré aux modèles mathématiques rencontrés dans la littérature pour décrire les mécanismes de sorption et de transfert de masse (§2.3) mais décrit aussi quelques modèles développés dans un but prédictif de limitation de la biodégradation. Seront cités entre autres les modèles de cinétiques et d'isothermes de sorption, des modèles combinant biodégradation et mécanismes d'immobilisation du polluant, et pour conclure, les nombres adimensionnels.

2.4.1. k_p et sorption

Un composé chimique dans un environnement aqueux contenant des particules se répartit selon son affinité entre la phase eau et la phase solide. Une estimation de la répartition entre phase eau et phase solide peut se traduire par une constante de partage k_p , rapport entre la quantité de composé piégé par le solide et la quantité restant en solution.

$$k_p = \frac{\text{composé dans/sur la phase solide}}{\text{composé en solution}} \quad (1)$$

Ce formalisme implique l'hypothèse d'une répartition linéaire et d'un équilibre entre les 2 phases, liquide et solide. La sorption met en jeu différents types de liaison (§3.2.1.), dépendant de la structure moléculaire de la molécule et de la nature des particules. Dans les sols, sédiments, la fraction matière organique est responsable d'une grande part de la sorption. Nombre d'études mettent en valeur une quantité de polluant sorbé plus importante, plus le pourcentage de carbone organique (directement proportionnel à la matière organique) est élevé (Gennari *et al.*, 1994 ; Guerin et Boyd, 1992 ; Murphy *et al.*, 1990 ; Pusino *et al.*, 1992 ; Wilson et Foy, 1992 ; Zhou *et*

al., 1994).

Si seule la matière organique est responsable de la sorption, alors k_p peut être normalisé par rapport à la fraction de carbone organique (F_{OC})

$$k_{OC} = \frac{k_p}{F_{OC}} \quad (2)$$

Il est possible de trouver des normalisations par rapport à la matière organique (k_{OM}). Dans ce cas, la matière organique est considérée comme contenant entre 53 et 63 % de carbone organique (CO) (Hamaker et Thomson, 1992 ; cités par Rutherford *et al.*, 1992) et souvent une moyenne de 58 % est retenue (Bintein and Deviller, 1994).

Les expériences de Rutherford *et al.* (1992) ainsi que celles de Li et Gupta (1994) confirment que k_{OC} est un mauvais estimateur de la constante de distribution d'un composé dans un sédiment ou un sol certainement à cause de l'hétérogénéité du système ne permettant jamais un partage de phase. Il est ainsi possible d'obtenir une variation d'un facteur 40 entre des valeurs de k_{OC} du benzène et du tétrachlorure de carbone (composé hydrophobes) pour différents types de matières organiques (Rutherford *et al.*, 1992) ou de pesticides polaires (Rodriguez-Gonzalo *et al.*, 1993). En effet, la quantité de composé retenu dépend non seulement de la quantité de matière organique présente, mais également de la qualité de la matière organique (Douset *et al.*, 1994) et nécessite l'hypothèse d'une adsorption uniquement par la matière organique (Li and Gupta, 1994).

2.4.1.1. Cinétiques de sorption

Une équation de modèle cinétique décrit la vitesse à laquelle le composé est adsorbé ou désorbé à (de) la surface du solide.

Il existe plusieurs modèles et la condition la plus simple de non équilibre est celle où la vitesse de sorption est fonction de la concentration du soluté restant en solution et où le soluté sorbé ne peut se désorber : la sorption est dite irréversible.

Le modèle de sorption irréversible du premier ordre s'écrit :

$$\frac{\delta q}{\delta t} = k_1 \cdot C \quad (3)$$

q : quantité de soluté adsorbé sur le solide à l'instant

k_1 : constante d'adsorption du premier ordre

C : concentration du soluté dans la phase liquide au temps t

Si la sorption est un processus réversible, il faut alors tenir compte de la constante de désorption k_2 . L'équation (3) devient alors :

$$\frac{\delta q}{\delta t} = k_1 \cdot C - k_2 q \quad (4)$$

Ces deux équations (3) et (4) dérivent des adsorptions de type linéaire, c'est-à-dire que le pourcentage sorbé reste le même, quelque soit la concentration initiale. De nombreux cas pratiques démontrent des adsorptions non linéaires. L'équation (5) est l'expression mathématique d'une sorption réversible mais non linéaire :

$$\frac{\delta q}{\delta t} = k_1 \cdot C^n - k_2 q \quad (5)$$

n est une constante représentant la non linéarité et par là même l'intensité d'adsorption.

Le dernier modèle cité ici est le modèle bilinéaire qui n'est autre que la version cinétique de l'isotherme de Langmuir, développée au paragraphe 2.4.1.3.

$$\frac{\delta q}{\delta t} = k_1 \cdot \varepsilon (q_m - q) - k_2 q \quad (6)$$

q_m : quantité maximale d'adsorbé de l'adsorbant.

Les cinétiques de sorption sont des processus généralement rapides : en quelques minutes, l'équilibre de sorption est atteint, c'est-à-dire que la quantité adsorbée devient constante. Par exemple, Ulrich *et al.* (1988), montrent qu'en 5 minutes l'équilibre d'adsorption de l'acide caprylique (C₈) sur une surface de mercure, mettant en jeu des interactions hydrophobes, est atteint. Zhang et Sparks (1993) ont adsorbé du phénol et de l'aniline sur une argile organique (montmorillonite comprenant de l'hexadécyltriméthylammonium). En moins de 40 minutes, l'équilibre d'adsorption mesuré en continu, est atteint.

En étudiant la sorption du toluène sur un sol, Robinson *et al.* (1990) se sont rendus compte que la sorption s'opérait en deux phases : une rapide suivie d'une phase beaucoup plus lente. Après le premier jour de l'expérience, les concentrations du toluène en solution sont abaissées à environ la moitié des valeurs initiales, démontrant une adsorption rapide. Après 45 jours, les concentrations en toluène ne semblent plus évoluer. Cependant, des analyses 5 mois plus tard

montrent une baisse de 10 % de la concentration en solution, ne pouvant être attribuée à une biodégradation ou à une perte par volatilisation (Figure 2.11).

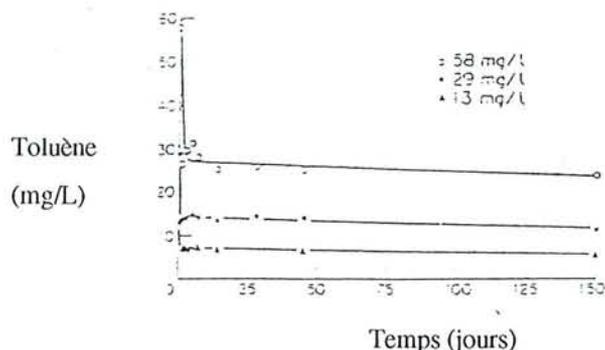


Figure 2.11 Sorption du toluène sur du sol stérile à trois concentrations initiales différentes (d'après Robinson *et al.*, 1990)

La figure 2.12 décrit l'évolution de la quantité adsorbée en fonction des concentrations pour des temps de réaction de 1, 4 ou 28 semaines. Une augmentation de la pente des droites est observée consécutivement à l'augmentation du temps de contact.

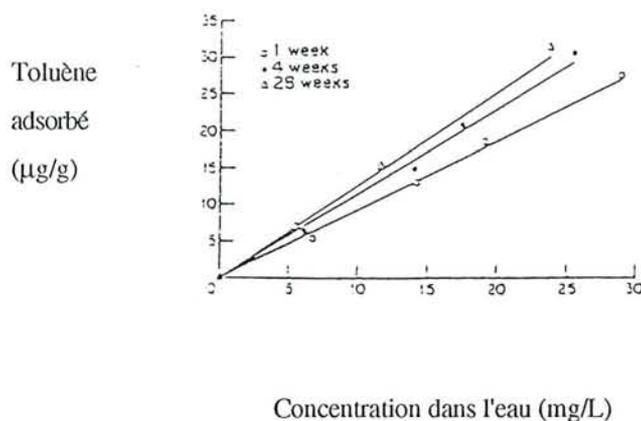


Figure 2.12. Isothermes d'adsorption du toluène à différents temps de l'équilibre (d'après Robinson *et al.*, 1990)

Il apparaît donc une première sorption rapide (1 jour) puis une seconde phase de sorption beaucoup plus lente sur une échelle de temps de quelques mois. Robinson *et al.* (1990) n'expliquent pas cette adsorption en deux temps. Il est probable, cependant, que la 2ème phase corresponde à une diffusion du toluène au sein de la matrice du sol : diffusion dans les pores des particules du sol et dans la matière organique, souvent organisée sous forme de chaînes qui s'enroulent sur elles-mêmes et induisent une nature non rigide et poreuse (Brusseau *et al.*, 1991).

2.4.1.2. Cinétiques d'adsorption prenant en compte la diffusion

La lente diffusion dans les pores et dans la matière organique d'un composé, explique les équilibres de sorption lents à s'établir dans les matériaux complexes et hétérogènes tels que les sols et sédiments. Deux processus sont responsables du non-équilibre de sorption : 1) diffusion interne and 2) transfert de masse interne ou diffusion de film (dans la couche limite).

a) Le modèle de diffusion intraparticulaire (transfert de masse interne) implique la diffusion du soluté dans la phase aqueuse située à l'intérieur des pores des particules. Ce modèle, développé par Wu et Gschwend (1986), est basé sur la diffusion radiale, et l'expression mathématique finale est donnée par l'équation (7) avec l'expression de la diffusivité intraparticulaire (8) fonction de la diffusivité dans l'eau (D_e), de la porosité du système (n), de la constante de partage k_p , de la densité des particules poreuses (ρ) et de la tortuosité τ .

$$D_{eff} = \frac{D_e f(n, \tau)}{(1-n)\rho k_p} \frac{\partial S(r)}{\partial t} = D_{eff} \left[\frac{\partial^2 S(r)}{\partial r^2} + \frac{2\partial S(r)}{r\partial r} \right] \quad (7)$$

$$D_{eff} = \frac{D_e f(n, \tau)}{(1-n)\rho k_p} \quad (8)$$

Wu and Gschwend (1986) ont appliqué leur modèle de façon satisfaisante à des suspensions de sol sous forme d'agrégats ou de sédiments naturels. Sur les hypothèses d'un équilibre instantané à l'intérieur des agrégats, une isotherme de sorption linéaire et une turbulence du milieu suffisante pour s'assurer que l'échange de sorption n'est pas limité par le transport à travers une couche limite, leurs résultats démontrent que les taux de disparition sont plus faibles pour les agrégats de plus grande taille.

Rijnaarts *et al.* (1990) ont utilisé le modèle de diffusion radiale développé par Wu et Gschwend (1986) pour expliquer l'effet de la taille des agrégats du sol sur la lente désorption de l'hexachlorocyclohexane. Comparé à un simple modèle du premier ordre de désorption, le modèle de diffusion radiale est mieux ajusté aux cinétiques expérimentales de désorption.

b) Stapleton *et al.* (1994) ont intégré au modèle de diffusion radiale la diffusion de film (transfert de masse externe) pour mesurer des vitesses d'adsorption et de désorption du pyrène, et plus généralement de polluants hydrophobes. Le modèle intégrant la diffusion de film convient mieux à leurs expérimentations réalisées avec des sédiments que le modèle de diffusion radiale présenté précédemment. Pour de fortes concentrations en solide (250 g/L) la diffusion de film est négligeable. Par contre, pour des concentrations plus faibles 6,7 g solide/L (Stapleton *et al.*, 1994), la diffusion de film devient le facteur limitant et implique que le temps requis pour atteindre l'équilibre de sorption augmente.

Dans des environnements non turbulents, mais aussi dans des systèmes à très faible

concentration en particules, la diffusion de film peut être le mécanisme limitant l'adsorption.

2.4.1.3. Isothermes

Le terme "isotherme" est employé pour indiquer que les mesures sont réalisées à température constante. L'isotherme de sorption décrit la proportion d'un composé en association avec le solide à l'équilibre. Cette proportion dépend de la concentration totale du composé dans la solution.

Il existe de nombreuses modélisations d'isothermes d'adsorption. Nous ne donnerons ici le détail que des deux modèles les plus fréquemment rencontrés : Langmuir et Freundlich.

(1) Langmuir

Dans l'hypothèse la plus simple, on admet que les sites d'adsorption à la surface d'un corps solide (l'adsorbant) (A) sont occupés par les espèces adsorbantes de la solution C avec une stoechiométrie :



avec A : sites d'adsorption de surface de l'adsorbant, C : soluté en solution, CA : soluté adsorbé en surface.

Si l'on applique la loi d'action de masse, l'équilibre peut s'écrire :

$$\frac{[C.A]}{[C][A]} = K_{ads} \quad (9)$$

En considérant un nombre maximal de sites de l'adsorbant A_T $[A_T] = [A] + [CA]$, l'équation (9) s'écrit :

$$[A] = A_T \frac{K_{ads}}{1 + K_{ads}} \quad (10)$$

En déduisant une concentration de surface $q = \frac{[CA]}{\text{masse de l'adsorbant}}$ et une concentration maximale d'adsorption $q_{mas} = \frac{[A_T]}{\text{masse ads}}$ il en résulte :

$$q = q_{max} \frac{K_{ad} [C]}{1 + k_{ads} [C]} \quad (11)$$

L'isotherme de Langmuir est applicable si l'affinité du composé en solution est la même pour tous les sites de surface et si l'équilibre est supposé monocouche (Sigg *et al.*, 1992) et si le nombre de sites est limité (Fetter, 1993).

La modélisation de Langmuir peut s'écrire sous une autre forme (Fetter, 1993) :

$$q = q_{\max} \frac{b C_e}{1 + b C_e} \quad (12)$$

avec $b = k_1/k_2 =$ ration des constante cinétiques d'adsorption et de désorption (§2.4.1.1)

Il est possible de modéliser une adsorption selon Langmuir si la surface comprend 2 types de sites

$$q = q_{\max 1} \frac{b_1 C}{1 + b_1 C} + q_{\max 2} \frac{b_2 C}{1 + b_2 C} \quad (13)$$

(2) Freundlich

L'isotherme de Freundlich s'écrit sous la forme mathématique :

$$q_e = K C_e^n \quad (14)$$

avec k et n les paramètres de Freundlich. k : quantité adsorbée par une concentration à l'équilibre de 1 g L^{-1} , n : représente l'intensité d'adsorption (Rodriguez-Gonzalo *et al.*, 1993) (degré de courbure de l'isotherme).

Schwarzenbach *et al.* (1993) donnent quelques définitions concernant les valeurs de n . Lorsque $n < 1$, plus les concentrations en molécules sont importantes, plus il devient difficile de sorber des molécules. C'est le cas lorsque les sites spécifiques sont saturés et que les sites restants ont moins d'affinité. Par contre, lorsque $n > 1$, les molécules sorbées en premier modifient la surface qui favorise alors d'adsorption. Et lorsque $n = 1$, tous les sites de surface ont la même réactivité et les propriétés du solide restent identiques à toutes les concentrations en solution.

2.4.1.4. Les QSARS

Les QSARS (Quantitative Structure Activity Relationship) sont des modèles mathématiques à but prédictif du transport d'un polluant dans l'environnement, de sa distribution entre 2 compartiments (degré de sorption), mais aussi de sa dégradation (Vasseur *et al.*, 1993 ; Kuenenmann *et al.*, 1990). Ces modèles mathématiques mettent en relation des activités

physiques, chimiques, biologiques ou environnementales avec des descripteurs structurels de la molécule ou bien avec ses propriétés physico-chimiques. Deux approches différentes de prédiction sont utilisées selon les auteurs : une approche utilisant les propriétés physico-chimiques, dont les descripteurs les plus usités sont solubilité, coefficient de partage octanol/eau k_{ow} , pK_a (Bintein et Devillers, 1994) ou une approche basée sur la structure chimique de la molécule (indices topologiques) (Brusseau, 1993 ; Lohninger, 1994 ; Reddy et Locke, 1994). L'hypothèse d'utilisation de ces modèles est qu'une variation de "l'activité" peut être corrélée avec les modifications des paramètres reflétant les propriétés moléculaires.

L'estimation de la sorption, par l'intermédiaire de k_{oc} est très étudiée. Fetter (1993) a comparé des k_{oc} estimés à partir de k_{ow} (12 modèles) ou à partir de la solubilité (5 modèles). Bien que la plupart des estimations corresponde aux valeurs expérimentales, il apparaît qu'il n'y a pas d'équation universelle reliant k_{oc} à k_{ow} pour toutes les classes de composés.

Les modèles sont restrictifs dans le sens où ils ne s'appliquent qu'à une seule classe de molécules (Lohninger, 1994 ; Reddy et Locke, 1994). De surcroît, il semblerait intéressant d'intégrer dans tous ces modèles de sorption, des paramètres descriptifs du sol, puisque l'intensité de la sorption du polluant est directement fonction de l'adsorbant.

A ce titre, Bintein et Devillers (1994) ont développé un modèle de sorption en se basant sur les propriétés moléculaires (k_{ow} , pK_a) mais aussi sur des propriétés du sol (pH et pourcentage de carbone organique) de façon à estimer le coefficient de partage k_p , de plusieurs classes de molécules ionisables et non ionisables (pesticides, hydrocarbures...)

Dans le modèle décrit par l'équation (15), la sorption, évaluée par le coefficient de distribution k_p entre la phase solide et la phase liquide (Bintein et Devillers, 1994), est prédite grâce aux propriétés d'hydrophobicité de la molécule (k_{ow} , coefficient de partage octand/eau) et de la fraction organique du sol.

$$\log k_p = 0,96 \log k_{ow} + 1,04 \log F_{oc} - 0,13 \quad (15)$$

Cette équation donne de bonnes prédictions quant aux molécules non ionisables uniquement. En intégrant les notions de pH du sol et de constante de dissociation de la molécule pK_a , le modèle devient :

$$\log k_p = 0,93 \log k_{ow} + 1,09 \log F_{oc} - 0,32 CFa - 0,55 C'Fb + 0,25 \quad (16)$$

CFa et C'Fb sont des paramètres qui prennent en compte le pH et le pK_a des molécules possédant des fonctions acides ou bases. Le modèle (équation 16) testé et validé, se révèle un bon estimateur de la sorption et démontre la possibilité de proposer une QSAR unique pour estimer le comportement de sorption de polluants organiques, contaminants potentiels des écosystèmes

coefficient de dégradation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique, S : quantité de substrat adsorbé, Xs : bactéries fixées, M : masse du sol, ksw : coefficient de minéralisation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique par les bactéries fixées.

L'application de chacune de ces 3 équations à la biodégradation de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique par *Flavobacterium* en présence de différentes concentrations en sol, montre que seul le modèle 3 décrit de façon correcte les résultats expérimentaux, confirmant que seul le substrat en solution est disponible pour les microorganismes.

A partir de la constatation d'Ogram *et al.* (1985), substrat adsorbé non disponible, Guerin et Boyd (1992) ont créé un modèle à 3 paramètres (équation 20) avec les hypothèses d'une désorption linéaire, d'une minéralisation totale du substrat et d'un système où l'équilibre d'adsorption / désorption est instantané :

$$P = v_2 t = [(v_1 + v_2)(1 - \exp(-kt))]/k \quad (20)$$

avec P : pourcentage de substrat minéralisé, k : constante de dégradation du 1er ordre, v₁ : taux initial de minéralisation, v₂ : taux de minéralisation de S qui désorbe.

L'équation (20) décrit en fait une minéralisation du substrat en solution selon une phase exponentielle, accompagnée d'une phase linéaire correspondant à la minéralisation du substrat qui désorbe. L'avantage réside dans la simplicité du modèle qui devient un modèle du premier ordre en conditions d'équilibre.

Ce modèle a été testé sur la biodégradation du naphthalène dans des sols et en présence de 2 souches pures, et semble bien mieux convenir qu'un modèle du premier ordre. Cependant, pour une des souches employées, *Pseudomonas putida* la quantité maximale de naphthalène dégradée (P_{max}) est supérieure à la valeur théorique prédite par l'équilibre d'adsorption. La seconde souche, au contraire de *Pseudomonas putida*, donne des valeurs qui se correspondent, suggérant que la biodisponibilité d'un composé est aussi spécifique de l'organisme vivant et pas seulement de la sorption.

Un autre modèle combinant une cinétique de biodégradation selon un premier ordre, et une sorption de type Langmuir a été développé par Miller et Alexander (1991). L'application de ce modèle à la dégradation de la benzylamine (adsorbée par un processus d'échange d'ions) en présence de IgL⁻¹ de particules de montmorillonite sodique correspond aux résultats expérimentaux avec une erreur maximale de 4 %.

Les hypothèses employées pour la construction sont tout à fait semblables à celles émises par Guerin et Boyd (1992) et Ogram *et al.* (1985) : pas de croissance bactérienne, sorption

réversible et équilibre de désorption instantané (hypothèse qui a été vérifiée expérimentalement), substrat adsorbé non dégradé, et surtout que les microorganismes ne facilitent pas la désorption.

En combinant une dégradation du 1er ordre et une isotherme de Langmuir modifiée (équation 21) on obtient une formulation mathématique de l'évolution de la concentration de substrat qui ne peut être résolue sous cette forme et nécessite l'utilisation d'une méthode numérique :

$$S = \frac{k C^n}{(A^n + C^n)} C \quad (21)$$

avec S : concentration totale en substrat, C : concentration totale en solution, A et k : constantes de Langmuir

Le dernier modèle présenté dans ce paragraphe est le modèle 2 compartiments, mis au point par Scow *et al.* (1986). La formulation du modèle 2 compartiments peut être représentée selon la schématisation (Figure 2.13)

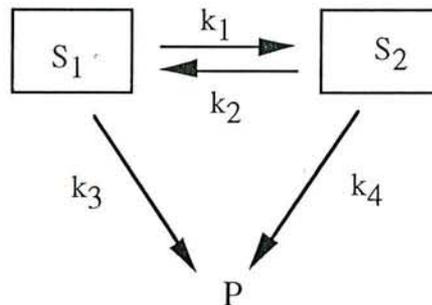


Figure 2.13. Modèle 2 compartiments (S₁ et S₂)

avec S₁ et S₂ : substrat dans les compartiments 1 et 2. S₁ est immédiatement disponible comparativement à S₂, P : produit de dégradation (ici CO₂) et k₁, k₂, k₃ et k₄ : constantes cinétiques du 1er ordre.

L'évolution du substrat dans chaque compartiment peut s'écrire :

$$\frac{dS_1}{dt} = - (k_1 + k_3) S_1 + k_2 S_2 \quad (22)$$

$$\frac{dS_2}{dt} = k_1 S_1 - (k_2 + k_4) S_2 \quad (23)$$

sur l'hypothèse que toutes les réactions sont du premier ordre et après une résolution matricielle, la

forme finale de l'équation est (24) :

$$P = \Psi_1 (1 - \exp(-\lambda_1 t)) + \Psi_2 (1 - \exp(-\lambda_2 t)) \quad (24)$$

avec λ_1 et λ_2 : paramètres matriciel, Ψ_1 et Ψ_2 : paramètres mathématiques combinant les constantes cinétiques du premier ordre et les concentrations dans les compartiments 1 et 2.

Une limitation de la minéralisation par la diffusion ou la sorption peut certainement expliquer que le modèle 2 compartiments convient mieux que d'autres modèles cités précédemment. S_1 représente le compartiment où le substrat est initialement disponible et S_2 le substrat séquestré dans les micropores du sol ou adsorbé en surface et non accessible aux microorganismes. Le substrat subit alors une faible minéralisation contrôlée par la vitesse de désorption ou de diffusion. Le point négatif de ce modèle est que la constante k_3 donne une mesure globale de la désorption et de la diffusion et qu'il est impossible de différencier ces deux mécanismes.

En conclusion, les modèles combinant adsorption / désorption et biodégradation conviennent bien de façon générale aux expérimentations, mais peuvent être améliorées en tenant compte de la diffusion du substrat (Scow *et al.*, 1986), d'isothermes de sorption non linéaires, de cinétiques de biodégradation plus réalistes et/ou de la croissance bactérienne.

2.4.3. Sorption / transfert de masse / biodégradation

Bien que les modèles intégrant sorption et biodégradation conviennent bien aux résultats expérimentaux, leur application est souvent limitée, car la diffusion du substrat dans les pores et dans la matrice du sol n'est pas prise en compte. L'intégration de la diffusion intraparticulaire (§2.4.1.2.) dans les modèles plus récents permet un ajustement meilleur aux courbes de dégradation en présence de particules poreuses.

Un modèle simple, couplant biodégradation et dissolution décrit le transfert de masse et la biodégradation dans un système où les composés hydrocarbures aromatiques sont relargués à partir d'une NAPL (non aqueous phase liquid) présents à concentration résiduelle de saturation dans un milieu microporeux (Figure 2.4). Le but de ce modèle est d'estimer l'importance de la limitation de la biodégradation par le transfert de masse. Le transfert de masse, ici la dissolution est exprimée par une loi de Raoult et la biodégradation est supposée du premier ordre. Ainsi,

l'expression mathématique proposée par Ramaswami *et al.* (1994) est :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \underbrace{(k_{La} (C_{eq} - C))}_{\text{dissolution}} - \underbrace{(kC)}_{\text{biodégradation}} \quad (25)$$

avec $\frac{\partial C}{\partial t}$: évolution de la concentration en hydrocarbure dans la phase aqueuse, k_{La} : coefficient de transfert de masse, k : constante de dégradation du premier ordre (pas de croissance bactérienne), C_{eq} : concentration à l'équilibre dans la phase aqueuse

Ce modèle est en fait très simple, mais aussi très restrictif car il ne s'applique qu'à des situations très particulières.

Ramaswami et Luthy (1992) avaient déjà développé un modèle plus général permettant d'aider à la compréhension des processus physico-chimiques pouvant affecter la biodégradation d'un hydrocarbure dans un système poreux. Ce système s'adresse à la dégradation bactérienne d'un composé organique lentement relargué dans la solution à partir d'une phase organique (Figure 2.11) présente dans les pores des particules.

Cinq processus ont été étudiés séparément :

- Dissolution du NAPL dans la phase aqueuse des pores
- Diffusion intraparticulaire dans la phase aqueuse des pores
- Sorption sur les parois des pores
- Transfert de masse de la surface des pores vers le milieu extérieur
- Biodegradation dans la phase aqueuse

1) La dissolution est décrite par une loi de Raoult :

$$C = x \cdot C_{PAH} \quad (26)$$

2) La sorption est décrite par une isotherme linéaire, 3) et la diffusion par un modèle de diffusion radiale (Wu et Gschwend, 1986) :

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{eff} \left[\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right] \quad (27)$$

4) Le transport de la surface dans la phase aqueuse est donné par une loi de Fick ou le coefficient de transfert de masse entre la particule et la phase aqueuse k_j vaut $\frac{D_e}{R}$

5) et la biodégradation est décrite par une loi du 1er ordre

avec C : concentration à l'équilibre dans l'eau, x : fraction molaire dans la NAPL, C_{PAH} : Solubilité de l'hydrocarbure dans l'eau, D_{eff} : diffusivité effective dans les pores, D_e : diffusivité dans l'eau, R : rayon de la particule poreuse.

L'approche de Ramaswami *et al.* (1992) présente l'avantage d'être complète parce que tous les processus sont considérés, même si le choix de l'approche mathématique appliquée n'est pas le meilleur. Elle permet, par combinaison des différents mécanismes de mimer un grand nombre de situations.

Mihelcic and Luthy (1991) ont quant à eux imaginé un modèle couplant désorption / diffusion et biodégradation pour l'appliquer à la dégradation du naphthalène désorbant de pores d'agrégats de sol. L'hypothèse de base est que le naphthalène adsorbé est complètement inaccessible aux microorganismes. De surcroît, la diffusion du naphthalène dans la phase aqueuse est supposée rapide par rapport à la diffusion intraparticulaire. Avec une adsorption linéaire et réversible, une diffusion intraparticulaire (Wu et Gschwend, 1986), une dégradation de type Monod, l'évolution de la concentration en naphthalène peut être exprimée ainsi :

$$\frac{dC}{dr} = - \frac{k_{max}C}{k_s + C} (1 - \rho k_d)^{-1} \quad (28)$$

avec k_{max} : Constante maximale de biodégradation, k_s : coefficient d'affinité, ρ : rapport Sol/Eau, k_d : coefficient de distribution d'adsorption linéaire

L'application du modèle a permis de montrer que la diffusion dans les pores est rapide comparativement à la biodégradation.

Scow et Hutson (1992) ont considéré de façon théorique l'effet de la diffusion et de la sorption sur la biodégradation. Le modèle, proche de celui de Ramaswami et Luthy (1992) décrit un système constitué d'agrégats poreux de même diamètre, porosité et densité placés dans une solution de volume constant. Initialement, le composé chimique est présent à l'intérieur des particules et à l'extérieur.

Le modèle nécessite comme hypothèses une sorption linéaire, une diffusion radiale (Wu et Gschwend, 1986) combinant un facteur de retard ($R = 1 + \rho k_a/\epsilon$) avec ϵ : porosité et ρ : densité du milieu aqueux, une biodégradation du premier ordre, et surtout l'impossibilité des microorganismes à pénétrer dans les pores.

Scow et Alexander (1992) ont alors appliqué ces théories à la biodégradation du glutamate et

du paranitrophénol en présence d'un support minéral (kaolinite) ou de billes d'exclusion de gel. Il en ressort que le modèle ne convient pas à toutes les situations et qu'il surestime parfois la biodégradation, en particulier pour les tailles d'agrégats les plus grosses. Les auteurs expliquent ces résultats par une (des) hypothèse(s) nécessaire(s) au développement du modèle non réunie(s) dans les conditions expérimentales (ex : la sorption n'est peut être pas linéaire). Les conclusions de l'étude insistent que pour prédire la persistance d'un composé organique biodégradable dans un sol ou tout système poreux, il est important de déterminer les propriétés du milieu poreux dont dépendent les cinétiques de transfert.

Les modèles décrits précédemment, même les plus complets, ne s'appliquent que dans des conditions bien particulières du fait des nombreuses hypothèses établies par les auteurs. Il ressort aussi, que bien que rarement prises en compte, la fixation/agrégation des microorganismes la production de surfactants ou de polymères ont une influence non négligeable sur la biodisponibilité.

2.4.4. Les nombres adimensionnels

Un groupe de trois nombres adimensionnels permet d'établir un critère d'évaluation de l'amplitude d'une réaction par rapport à une autre. Ces nombres déterminent sous quelles conditions de taille de l'agrégat, de capacité d'adsorption, de diffusivité intraparticulaire et de cinétique de biodégradation, l'implication de la sorption ou de la diffusion peut être ignorée. Ce sont le module de Thiele, le nombre de Biot et le nombre de Damkohler qui expriment chacun l'importance relative d'un processus par rapport à un autre. Ils sont estimés à partir d'expériences indépendantes réalisées en laboratoire et ont un rôle prédictif. Leur expression mathématique dérive des équations données dans les paragraphes précédents.

Le module de Thiele, noté Φ exprime le taux maximal de biodégradation par rapport à la diffusion max dans les pores. Si Φ est inférieur à 1, la cinétique de biodégradation est limitante. A l'inverse, si Φ est supérieur à 1, la diffusion limite la biodégradation.

Le nombre de Biot, noté β , est le rapport entre le transfert de masse maximal dans la phase aqueuse et la diffusion maximale dans les pores.

Enfin, le nombre de Damkohler, $Dmkl$, exprime le transfert de masse dans la phase aqueuse par rapport au taux maximal de biodégradation.

Dans un but de compléter les travaux de Scow et Hutson (1992), Chung *et al.* (1993) ont appliqué les nombres adimensionnels aux expériences de Scow and Alexander (1992). Un calcul

du module de Thiele donne une valeur de Φ d'environ 3,3 pour la dégradation du glutamate et du phénol par *Pseudomonas sp.* en présence de kaolinite. Le taux de diffusion est donc environ 3 fois plus faible que celui de biodégradation et explique comme le modèle Diffusion-sorption-biodégradation, que la consommation du substrat est limitée par la diffusion intraparticulaire.

Tout comme les modèles, ils n'intègrent pas le paramètre "microorganismes", c'est-à-dire s'ils sont fixés, s'ils sont agrégés, s'ils peuvent sécréter des substances telles que des polymères ou des tensioactifs. Ces nombres peuvent cependant très utiles dans la prédiction du mécanisme limitant la biodégradation et donc de la persistance de polluants dans les milieux poreux.

2.5. Conclusions et perspectives

La présence de particules minérales ou organiques, poreuses ou non, et la présence d'interfaces liquide/liquide modifie la biodisponibilité d'un composé organique, donc sa biodégradation. La biodisponibilité d'un polluant a été abordée de deux points de vue : celui de polluant et de celui des microorganismes.

La biodisponibilité du polluant dépend de son statut physique dans le milieu. Deux mécanismes de rétention semblent prédominer dans la diminution de la biodisponibilité : la sorption par réduction de la concentration du composé en solution et/ou par des cinétiques de désorption limitantes et la diffusion dans les pores des particules poreuses.

L'aspect biologique, bien que très souvent négligé, est très important tant au point de vue des capacités de dégradation des microorganismes, que de leur forme (microorganismes agrégés, emprisonnés dans un réseau de polymères, entourés de particules minérales et organiques).

Augmenter la biodisponibilité des polluants c'est les rendre plus accessibles, diminuer leur persistance et augmenter leurs vitesses d'élimination. S'appuyant sur cette recherche bibliographique, divers moyens peuvent être envisagés pour augmenter la biodisponibilité, soit en agissant sur les microorganismes soit en agissant sur le polluant.

L'amendement d'un sol en éléments nutritifs, en microorganismes dégradeurs de façon à pallier les manques du milieu naturel, est déjà une méthode pratiquée de façon industrielle pour la dépollution des sites contaminés.

L'augmentation de la température se révèle une méthode à double fonction. Elle permet d'une part l'augmentation de l'activité biologique dans un sol et augmente la désorption du polluant. Zhang et Bouwer (1995) ont simulé mathématiquement une augmentation de la température sur la biotransformation du naphthalène dans une colonne de laboratoire remplie de sol. La vitesse maximale de dégradation augmente de 0,005mg/mg_{cellule}/h pour une température de 10°C à 0,017 pour 22°C.

L'utilisation de tensio-actifs peut être une solution envisageable pour augmenter la

biodégradation d'un polluant dans un sol. Les tensio-actifs sont des composés possédant un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. Ils aident à augmenter de la solubilité de composés faiblement solubles et à désorber les polluants retenus par des surfaces (Aronstein *et al.*, 1991; Aronstein et Alexander, 1992). Ils augmentent les vitesses de dissolution des hydrocarbures (Volkering *et al.*, 1995) et changent l'affinité entre la cellule bactérienne et l'hydrocarbure en augmentant l'hydrophobicité de surface des cellules (Zhang et Miller, 1994). L'emploi de tensio-actifs non ioniques en faibles concentrations (Aronstein et Alexander, 1992; 1993) stimule la biodégradation du phénanthrène et du biphényl dans un sol. Sur ces constatations, les auteurs suggèrent que les tensioactifs peuvent être utiles pour la bioremédiation in situ de sites contaminés par des polluants hydrophobes.

L'emploi des tensio-actifs nécessite d'être prudent car dans certains cas, ils peuvent induire une limitation de la biodégradation (Aronstein *et al.*, 1991; Laha et Luthy, 1991; 1992). C'est le cas avec une concentration supérieure à la CMC, ou quand le tensioactif est préféré au substrat par les microorganismes (Thiem, 1994).

Intervenir de façon directe sur les microorganismes est un autre moyen d'améliorer la biodisponibilité. Il semblerait d'ailleurs que les microorganismes ayant des "propriétés" de fixation réversible soient plus à même de consommer un substrat adsorbé qu'une bactérie qui se fixe irréversiblement (Guerin et Boyd, 1992; Hermansson et Marshall, 1985). Guerin et Boyd (1992) montrent d'ailleurs que *Pseudomonas putida*, souche chimiotactile se fixant de façon réversible est capable de dégrader le naphthalène initialement adsorbé, contrairement à la seconde souche qui elle se fixe irréversiblement. Le doute reste cependant établi quant à une consommation directe ou à une induction d'une désorption préalable par production de solubilisants. Il est bien connu que certains microorganismes et en particulier *Pseudomonas aeruginosa* sont capables, sous des conditions de culture particulières, de produire des molécules possédant des propriétés de tensioactif (biosurfactants). Ces sécretions naturelles ont la propriété d'augmenter la solubilité et ainsi la biodégradation (Zhang et Miller, 1992; 1994; 1995).

Références bibliographiques

- ADU-WUSU K. and W.R. WILCOX, 1991,
Sorption and desorption isotherms for salicylate on gibbsite,
J. Colloids & Interface Sci., **143**, 139-145.
- AL BASHIR B., T. CSEH, R. LEDUC and R. SAMSON, 1990,
Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil
under denitrifying conditions,
Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 414-419.
- ALLARD A.S., P.A. HYNNING, M. REMBERGER and A.H. NEILSON, 1994,
Bioavailability of chlorocatechols in naturally contaminated sediment samples and of
chloroguaiacols covalently bound to C2-Guaiacyl residues,
Appl. Environ. Microbiol., **60**, 777-784.
- ARONSTEIN B. N. and M. ALEXANDER, 1993,
Effect of a non-ionic surfactant added to the soil surface on the biodegradation of aromatic
hydrocarbons within the soil,
Appl. Microbiol. Biotechnol., **39**, 386-390.
- ARONSTEIN B. N. and M. ALEXANDER, 1992,
Surfactants at low concentration stimulate biodegradation of sorbed hydrocarbons in sample
in aquifer sands and soil slurries,
Environ. Toxicol. Chem., **11**, 1227-1233.
- ARONSTEIN B. N., Y. M. CALVILLO, and M. ALEXANDER, 1991,
Effect of surfactants at low concentrations in the desorption and biodegradation of sorbed
aromatic compounds in soil,
Environ. Sci. Technol., **25**, 1728-1731.
- BERTHELIN J., C. LEYVAL et F. TOUTAIN, 1994,
Biologie des sols : Rôle des organismes dans l'altération et l'humification,
in Pédologie 2, Constituants et propriétés du sol, 2^o Edition, M. Bonneau & B. Souchier
(eds), Masson, 143-237.
- BERTIN G. et M. SCHIAVON, 1989,
Les résidus non extractibles de produits phytosanitaires dans les sols,
Agronomie, **9**, 117-124.
- BOUWER E.J. and A.J.B. ZEHNDER, 1993,
Bioremediation of organic compounds-putting microbial metabolism to work,
TIBTECH, **11**, 360-367.
- BRUSSEAU M.L., 1993,
Using QSAR to evaluate phenomenological models for sorption of organic compounds by
soil,
Environ. Sci. Technol., **12**, 1835-1846.
- BINTEIN S. and J. DEVILLERS, 1994,
QSAR for organic chemical sorption in soils and sediments,
Chemosphere, **28**, 1171-118.
- BRUSSEAU M.L., R.E. JESSUP and P.S.C. RAO, 1991,
Nonequilibrium sorption of organic chemicals : elucidation of rate-limited processes,
Environ. Sci. Technol., **25**, 134-142.

- BURNS R.G., 1980,
Microbial Adhesion to surfaces, R.C.W. Berkekey, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (ed), Ellis Horwood, Chichester, UK.
- CHOTTE J.L., L. JOCTEUR MONROZIER, G. VILLEMIN et F., TOUTAIN , 1992,
Effet du mode de dispersion du sol sur la localisation de sa biomasse microbienne, cas d'un vertisol,
Cah. Orstom, Sér. Pédol., 1, 81-95.
- CHUNG G.Y., B.J. Mc COY and K.M. SCOW, 1993,
Criteria to assess when biodegradation is kinetically limited by intraparticle diffusion and sorption,
Biotechnol. Bioeng., 41, 625-632.
- COBB G.D. and E.J. BOUWER, 1991,
Effect of electron acceptors on halogenated organic compound biotransformations in a biofilm column,
Environ. Sci. Technol., 25, 1068-1074.
- DASHMAN T. and G. STOTZKY, 1986,
Microbial utilization of amino acids and peptide bound on homoionic montmorillonite and kaolinite,
Soil Biol. Biochem., 18,5-14.
- DOUSSET S., C. MOUVET and M. SCHIAVON, 1994,
Sorption of terbutylazine and atrazine in relation to the physico-chemical properties of three sols,
Chemosphere, 28, 467-476.
- DURANT N.D., L.P. WILSON and E.J. BOUWER, 1995,
Microcosm studies of subsurface PAH-degrading bacteria from a former manufactured gas plant,
J. Contam. Hydrol., 17, 213-237.
- FENDORF S.E., D.L. SPARKS, M. FENDORF and R. GRONSKY, 1992,
Surface precipitation reactions on oxide surfaces,
J. Colloids & Interface Sci., 148, 295-298.
- FETTER C.W. (ed), 1993,
Transformation, retardation and attenuation of solutes,
in Contaminant Hydrogeology, Maxwell Publishing Company, New York, 115-162.
- FU M., H. MAYTON and M. ALEXANDER, 1994,
Desorption and biodegradation of sorbed styrene in soil and aquifers solids,
Environ. Toxicol. Chem., 13, 749-753.
- GUERIN W.F. and S.A. BOYD, 1992,
Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species,
Appl. Environ. Microbiol., 58, 1142-1152.
- GORDON A.S. and J.F. MILLERO, 1985,
Adsorption mediated decrease in the biodegradation rate of organic compounds,
Microb. Ecol., 11, 289-298.
- HARMS H. and A.J.B. ZEHNDER, 1994,
Influence of substrat diffusion on degradation of dibenzofural and 3-chlorodibenzofuran by attached and suspended bacteria,
Appl. Environ. Microbiol., 60, 2736-2745.

- HARMS H. and A.J.B. ZEHNDER, 1995,
Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran,
Applied Environ. Microbiol., 61, 27-33.
- HERMANSSON M. and K.C. MARSHALL, 1985,
Utilization of surface localised substrate by non adhesive marine bacteria,
Microb. Ecol., 11, 91-105.
- HOLM P.E. , P.H. NIELSEN, H.J. ALBRECHTSEN and T.H. CHRISTENSEN, 1992,
Importance of unattached bacteria and bacteria attached to sediment in determining potentials
for degradation of xenobiotic organic contaminants in an aerobic aquifer,
Appl. Environ. Microbiol., 58, 3020-3026.
- KEFFORD B., S. KJELLEBERG and K.MARSHALL, 1982,
Bacterial scavenging : utilization of fatty acids localized at solid-liquid interface,
Arch. Microbiol., 133, 257-260.
- KNAEBEL D.B., T.W. FEDERLE, D.M. McAVOY and J.R. VESTAL, 1994,
Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic
compounds in a natural soil,
Appl. Environ. Microbiol., 60, 4500-4508.
- KUENEMANN P., P. VASSEUR and J. DEVILLERS , 1990,
Structure - biodegradability relationships,
in Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationship in Environmental
Chemistry and Toxicology, ECSC, Brussels, W. Kaecher and J. Devillers (eds), 343-370.
- KUKKONEN J. and A. OIKARI, 1991,
Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic
materials,
Wat. Res., 25, 455-463.
- KUNC F. and G. STROTZKY, 1986,
Acceleration of aldehyde decomposition in soil by montmorillonite,
Soil Science, 124, 167-172.
- LAHA S. and R.G. LUTHY, 1991,
Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactant in soil-water systems,
Environ. Sci. Technol., 25, 1920-1930.
- LAHA S. and R.G. LUTHY, 1992,
Effect of non ionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in
soil-water systems,
Biotechnol. Bioeng., 40, 1-14.
- LANDRUM P.F., B.J. EADIE and W.R. FAUST, 1992,
Variation in the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod
Diporeia (spp) with sediment aging,
Environ. Toxicol. Chem., 11, 1197-1208.
- LI Y. and G. GUPTA, 1994,
Adsorption/desorption of hydrocarbons on clay minerals,
Chemosphere, 28, 455-463.
- LOHNINGER H., 1994,
Estimation of soil partition coefficients of pesticides from their chemical structure,
Chemosphere, 29, 1611-1626.

- MANILAL V. B. and M. ALEXANDER, 1991,
Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil,
Appl. Microbiol. Biotechnol., **35**, 401-405.
- MARSHALL K.C., 1980,
Adsorption of microorganisms to soils and sediments,
in Adsorption of microorganisms to surfaces, 317-329, G. BITTON and K.C. MARSHALL,
(eds) John Wiley & Sons, New York.
- MARSHALL K.C. and G. BITTON, 1980,
Microbial adhesion in perspective,
in Adsorption of microorganisms to surfaces, 1-5, G. BITTON and K.C. MARSHALL, (eds),
John Wiley & Sons, New York.
- McBRIDE M.B., T.J. PINNAVAIA and M.M. MORTLAND, 1975,
Adsorption of aromatic molecules by clays in aqueous suspension,
in Fate of Pollutants in the air and water environments, I.H. Suffet (ed), John Wiley & Sons.
- MEYER-REIL L.A., 1991,
Ecological aspects of enzymatic activity in marine sediments,
in Microbial Enzymes in Aquatic Environments, Chapter 5, 84-95, R.J. Chrost (ed), Springer-
verlag, New York.
- MIHELICIC J.R. and R.G. LUTHY, 1991,
Sorption and microbial degradation of naphthalene under denitrification conditions,
Environ. Sci. Technol., **15**,
- MILLER M.E. and M. ALEXANDER, 1991,
Kinetics of bacterial degradation of benzylamine in a montmorillonite suspension,
Environ. Sci. Technol., **25**, 240-245.
- OGRAM A. V., R. E. JESSUP, L. T. OU and P. S. C. RAO, 1985,
Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in
soils,
Appl. Environ. Microbiol., **49**, 582-587.
- ORTEGA-CALVO J.J. and M. ALEXANDER, 1994,
Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of
naphthalene initially present in nonaqueous-phase liquids,
Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2643-2646.
- PARSONS J.R., 1992,
Influence of suspended sediment on the biodegradation of the chlorinated dibenzo-p-dioxins,
Chemosphere, **25**, 1973-1980.
- PRICE N.M. and M.M. MOREL, 1990,
Role of extracellular enzymatic reactions in natural water,
in Aquatic Chemical Kinetics, Chapter 8, 235-257, W. Stumm (ed) Wiley Interscience
Publication, John Wiley & Sons, New York.
- QUIQUAMPOIX H., 1995,
Enzymes and proteins, interactions with mineral surfaces, in The encyclopedia of soil
Sciences and technology, 2nd Edition, C.W. FINKL (ed) Chapman & Hall, in Press.
- QUIQUAMPOIX H., 1987,
A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil I. Effect of
electrostatic interactions on the conformation of a β -D-galactosidase adsorbed on different
mineral surfaces,
Biochimie, **69**, 753-763.

- QUIQUAMPOIX H., 1987,
A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil II.
Competitive effect of the adsorption of a β -D-galactosidase in mixed mineral and organo-mineral systems,
Biochimie, 69, 765-771.
- QUIQUAMPOIX H., P. CHASSIN and R.G. RATCLIFFE, 1989,
Enzyme activity and cation exchange as tools for the study of the conformation of proteins adsorbed on mineral surfaces,
Progr. Colloid Polym. Sci., 79, 59-63.
- QUIQUAMPOIX H., S. STAUNTON, M.H. BARON and R.G. RATCLIFFE, 1993,
Interpretation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil,
Colloids Surface, 75, 85-93.
- RAMASWAMI A., S. GHOSHAL and R.G. LUTHY, 1994,
Mass transfer and biodegradation of PAH compounds from coal tar,
Wat. Sci. Tech., 30, 61-70.
- RAMASWAMI A. and R.G. LUTHY, 1992,
Modeling the dissolution and biodegradation of PAH compounds from hydrocarbon at residual saturation in microporous media,
Progress Report to Texaco Inc., Research and Development, Beacon, New York, 1-23.
- REDDY K.N. and M.A. LOCKE, 1994,
Prediction of soil sorption (K_{oc}) of herbicides using semi-empirical molecular properties,
Weed Science, 42, 453-461.
- RIJNAARTS H.H.M., A. BACHMANN, J.C. JUMELET and A.J.B. ZEHNDER 1990,
Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of α -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil,
Environ. Sci. Technol., 24, 1349-1354.
- ROBERTS A.L. and P.M. GSCHWEND, 1994,
Interaction of abiotic and microbial processes in hexachloroethane reduction in groundwater,
J. Contam. Hydrol., 16, 157-174.
- ROBINSON K.G., W.S. FARMER and J.T. NOVAK, 1990,
Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria,
Wat. Res., 24, 3456-350.
- RODRIGEZ-GONZALO, M.J. SANCHEZ-MARTIN and M. SANCHEZ-CAMAZANO, 1993,
Adsorption of parathion and paraoxon by modified montmorillonites,
Toxicol. Environ. Chem., 37, 157-163.
- RUTHERFORD D.W., C.T. CHIOU and D.E. ELKE, 1992,
Influence of soil organic matter composition on the partition of organic compounds,
Environ. Sci. Technol., 26, 336-340.
- SAMUELSSON M.O. and D. L. KIRCHMAN, 1990,
Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface hydrophobicity,
Appl. Environ. Microbiol., 26, 2643-2648.
- SCHIAVON M., F. JAQUIN et C. GOUSSAULT, 1977,
Blocage des molécules s-triaziniques par la matière organique,
in Soil organic matter studies, International Atomic Energy Agency, 327-332.

SCHWARZENBACH R.P., P.H. GSCHWEND and D.M. IMBODEN (eds), 1993,
Environmental Organic Chemistry,
John Wiley & Sons inc., New York.

SCOW K.M. and M. ALEXANDER, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : experimental results with
synthetic aggregates,
Soil Sci. Soc. Am. J., 56, 128-134.

SCOW K.M. and J. HUTSON, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : theoretical considerations,
Soil Sci. Soc. Am. J., 56, 119-127.

SCOW K.M., S. SIMKINS and M. ALEXANDER, 1986,
Kinetics of mineralization of organic compounds at low concentration in soil,
Appl. Environ. Microbiol., 51, 1028-1035.

SCRIBNER S.L., T.R. BENZING, S. SUN and S.A. BOYD, 1992,
Desorption and bioavailability of aged simazine residues in soil from a continuous corn field,
J. Environ. Qual., 21, 115-120.

SHIMP R.J. and R.L. YOUNG, 1988,
Availability of organic chemicals for biodegradation in settled bottom sediments,
Ecotox. Environ. Safety, 15, 31-45

SIGG L., W. STUMM and P. BEHRA (eds), 1992,
Chimie aux interfaces,
in Chimie des milieux aquatiques, 307-344, Masson, Paris.

STAPLETON J.M., J.R. MIHELIC and D.R. LEUKING, 1994,
Adsorption and desorption kinetics of pyrene onto a Great Lakes sediment,
J. Great Lakes Res., 20, 561-568.

STEVENS T.O., R.L. CRAWFORD and D.L. CRAWFORD, 1990,
Biodegradation of dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) in several Idaho soils with various
dinoseb exposure histories,
Appl. Environ. Microbiol., 56, 133-139.

STAUNTON S. and H. QUIQUAMPOIX, 1994,
Adsorption and conformation of bovine serum albumine on montmorillonite: modification of
the balance between hydrophobic and electrostatic interactions by protein methylation and pH
variation,
J. Colloid Interface Sci., 166, 89-94.

STUCKY G. and M. ALEXANDER, 1987,
Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds,
Appl. Environ. Microbiol., 53, 292-297.

SUBBA RAO R.V. and M. ALEXANDER, 1982,
Effect of sorption on mineralization of low concentrations of aromatic compounds in lake
water samples,
Appl. Environ. Microbiol., 44, 659-668.

TIEHM A., 1994,
Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants,
Appl. Environ. Microbiol., 60, 258-263.

- THOMAS J.M. and M. ALEXANDER, 1987,
Colonization and mineralization of palmitic acid by *Pseudomonas pseudoflava*,
Microbiol. Ecol., 14, 75-80.
- THOMAS J.M., J.A. YORDI, J.A. AMADOR and M. ALEXANDER, 1986,
Rate of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds,
Appl. Environ. Microbiol., 52, 290-296.
- THOMAS J.M. and C.H. WARD, 1989,
In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface,
Environ. Sci. Technol., 23, 760-766.
- UKRAINCZYK L. and M. B. McBRIDE, 1992,
Oxidation of phenol in acidic aqueous suspensions of manganese oxides,
Clays and Clay Minerals, 40, 157-166.
- ULRICH H.J., W. STUMM and B. COSOVIC, 1988,
Adsorption of aliphatic fatty acids on aquatic interfaces. Comparison between two model
surfaces : the mercury electrode and δ -Al₂O₃ colloids,
Environ. Sci. Technol., 22, 37-44.
- VAN LOOSDRECHT M. C. M., J. LYKLEMA, W. NORDE and A. J. B. ZEHNDER , 1990,
Influence of interfaces on microbial activity ,
Microbiol. Rev., 54, 75-87.
- VASSEUR P. KUENEMANN and J. DEVILLERS , 1993,
Quantitative structure biodegradability relationships for predictive purposes,
in Chemical Exposure Predictions, Davide Calamari (ed), Lewis publishers, 47-61.
- VOLKERING F., A.M. BREURE and J.G. VAN ANDEL, 1993,
Effect of microorganisms on the bioavailability and degradation of crystalline naphthalene,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 535-540.
- VOLKERING F., A.M. BREURE, J.G. VAN ANDEL and W.H. RULKENS, 1995,
Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic
hydrocarbons,
Appl. Environ. Microbiol., 61, 1699-1705.
- WARD T.E. and R.J. LARSON, 1989,
Biodegradation kinetics of linear alkylbenzene sulfonate in sludge-amended agricultural soils,
Ecotox. Environ. Safety, 17, 119-130.
- WEBER J.B. and H.D. COBLE, 1968,
Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays,
J. Agri. Food Chem., 16, 475-478.
- WODINSKI R.S. and D. BERTOLINI, 1972,
Physical state in which naphthalene and biphenyl are utilized by bacteria,
Appl. Microbiol., 23, 1077-1081.
- WSZOLEK P.C. and M. ALEXANDER, 1979,
Effect of desorption on the biodegradation of n-alkylamines bound to clay,
J. Agri. Food Chem., 27, 410-414.
- WU S.C. and P.M. GSCHWEND, 1986,
Sorption kinetics of hydrophobic organic compounds to natural sediments and soils,
Environ. Sci. Technol., 20, 717-725.

ZHANG W., E. BOUWER, L. WILSON and N. DURAN, 1995,
Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms,
Wat. Sci. Technol., 31, 1-14.

ZHANG Y. and R.M. MILLER, 1992,
Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid
surfactant (biosurfactant),
Appl. Environ. Microbiol., 58, 3276-3282.

ZHANG Y. and R.M. MILLER, 1994,
Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and degradation
of octadecane,
Appl. Environ. Microbiol., 60, 2101-2106.

ZHANG Y. and R.M. MILLER, 1995,
Effect of rhamnolipid (biosurfactant) structure on solubilization and biodegradation of n-
alkanes,
Appl. Environ. Microbiol., 61, 2247-2251.

CHAPITRE 3

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 3. Matériel et méthodes	50
3.1. <i>Burkholderia cepacia</i>	50
3.1.1. Identification de <i>Burkholderia cepacia</i>	50
3.1.1.1. La coloration de Gram	50
3.1.1.2. Le test oxydase	50
3.1.1.3. Profil enzymatique	51
3.1.2. Test d'adhésion à l'octane	51
3.1.3. Numération des bactéries cultivables sur milieu gélosé.....	52
3.1.4. Numération du nombre total de bactéries.....	52
3.2. Milieu minéral	53
3.3. Milieu naphthalène.....	54
3.4. Préparation des supports adsorbants	54
3.4.1. Montmorillonite sodique	54
3.4.2. Complexe montmorillonite sodique / polyacrylamide neutre	56
3.4.3. Argile organique (montmorillonite + tensioactif) B34.....	57
3.4.4. Sédiment	58
3.5. Dosage du carbone organique dissous (COD)	58
3.6. Dosage du naphthalène	58
3.7. Extraction du naphthalène adsorbé	59
3.8. Dosage des cations (NH ₄ , K	59
3.9. Méthode d'ensemencement des essais de biodégradation	60
3.10. Observations en microscopie électronique	61
3.10.1. Microscopie électronique à balayage	61
3.10.2. Microscopie électronique à transmission	61
3.10.3. Colorations spécifiques des coupes pour la MET	62
3.10.3.1. Coloration de contraste.....	62
3.10.3.2. Mise en évidence des protéines	63
3.10.3.3. Mise en évidence des polysaccharides (réaction de Thiery)	63
3.11. Modèles	64
3.11.1. Cinétiques d'adsorption et de désorption	64
3.11.2. Isothermes d'adsorption et de désorption.....	64
3.11.3. Volatilisation	65
3.11.4. Déduction de la volatilisation	65
3.11.5. Cinétiques de biodégradation	65
3.11.6. Calcul de la diffusivité du naphthalène à une température donnée	66
3.11.7. Diffusion dans la couche limite	66
3.11.8. Calcul de la diffusivité du naphthalène à travers une membrane	67
3.11.9. Calcul de la diffusivité intraparticulaire du naphthalène.....	68
3.12. Chambres de mesure de diffusion	68

Chapitre 3. Matériel et méthodes

3.1. Burkholderia cepacia

3.1.1. Identification de *Burkholderia cepacia*

L'identification de *Burkholderia* (ex*Pseudomonas*) *cepacia* (Liste de Validation n°45, 1993) a été réalisée à l'aide de plusieurs tests. La souche est repiquée au préalable au moins 3 fois sur gélose nutritive complémentée en naphthalène en boîte de Pétri afin de vérifier sa pureté.

Le milieu solide utilisé pour conserver et compter les bactéries est constitué d'une gélose nutritive (BioMérieux) à 31g L^{-1} dans de l'eau Milli-Q additionnée de 50mg L^{-1} de naphthalène (Sigma). La solution se réalise à chaud jusqu'à ébullition en agitant constamment puis est autoclavée à 121°C pendant 20 minutes et répartie dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre. Après refroidissement, les boîtes sont conservées à une température de 4°C.

Les tests d'identification de la souche effectués sont : la coloration de Gram, le test oxydase et l'utilisation de galeries Api pour la détermination du profil enzymatique.

3.1.1.1. La coloration de Gram

La coloration de Gram est constituée de 4 étapes successives que sont la coloration par le cristal violet (Diagnostica Merck), le mordantage par le lugol (Diagnostica Merck), la décoloration à l'alcool et une coloration de contraste à la safranine (Diagnostica Merck)

Un frottis est réalisé sur une lame de verre avec une colonie âgée de 72 heures prélevée sur gélose nutritive. Les colorations successives sont réalisées sur le frottis selon la méthode spécifiée par Merck.

Un examen au microscope à immersion (grossissement x1000) entre lame et lamelle permet de classer les bactéries en 2 grandes catégories : les bactéries "Gram positif" gardent leur coloration violette après décoloration à l'alcool et les bactéries "Gram négatif", décolorées à l'alcool et teintées par la safranine apparaissent roses ou rouges sous l'objectif.

3.1.1.2. Le test oxydase

Une goutte d'eau Milli-Q (Millipore) est déposée sur un disque stérile (5 592 2, BioMérieux) posé sur une lame porte-objet. Des colonies à tester sont prélevées stérilement à l'aide d'une pipette pasteur en verre boutonnée et sont déposées sur le filtre.

L'apparition d'une couleur rose violette sur le disque humide après un temps de réaction de 1 à 2 minutes prouve l'existence d'une oxydase dans le système enzymatique du germe.

3.1.1.3. Profil enzymatique

Le profil enzymatique est réalisé par galerie Api 20NE. La galerie Api 20NE (BioMérieux 20050) permet l'identification de bacilles Gram négatifs non entérobactéries. La galerie 20NE est un système standardisé combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation. La lecture des réactions (24h pour les 8 premiers tests et 48h pour les 12 tests des sucres) conduit à un numéro d'identification correspondant à une espèce bactérienne. La souche *Burkholderia cepacia* est une bactérie Gram négative, oxydase positive et dont les autres caractéristiques du profil sont reprises dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1. Récapitulatif des tests en galerie Api pour *Burkholderia cepacia* (Triplikat)

NO2	+	+	+
N2	-	-	-
TRP	-	-	-
GLU	-	-	-
ADH	-	-	-
URE	-	-	-
ESC	-	-	-
GEL	-	-	-
PNPG	+	+	+
Glu	+	+	+
Ara	+	+	+
Mne	+	+	+
Man	+	+	+
Nag	+	+	+
Mal	-	-	-
Gnt	+	+	+
Cap	+	+	+
Adi	+	+	+
Mlt	+	+	+
Cit	+	+	+
Pac	+	+	+
OXI	+	+	+

3.1.2. Test d'adhésion à l'octane

Le test d'adhésion aux hydrocarbures (Test AMH) permet d'approcher le caractère hydrophobe des bactéries (Rosenberg *et al.*, 1980, modifié par Jorand *et al.*, 1995). Un

échantillon contenant une suspension microbienne est agitée avec un composé hydrocarboné (octane). L'émulsion formée à l'interface eau/octane après repos contient les microorganismes dit "hydrophobes".

Trois tubes de verre de 10mL et de 10mm de diamètre contenant 2,5mL de suspension bactérienne et 1mL d'octane sont agités pendant 120 secondes sur un plateau vibrant à vitesse maximale. Une série de 3 tubes témoins est réalisé comme l'échantillon en triplicat. Les 6 tubes sont agités ensemble. Après 5 minutes de repos, la phase aqueuse (inférieure) de chaque tube est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et déposée dans une cuve en verre pour mesurer la DO à 600nm (DO_e). La DO de chaque témoin agité (DO_t) est également mesurée. L'hydrophobicité (A%) est exprimée comme le pourcentage de bactéries retenues à l'interface par l'octane par rapport aux valeurs de turbidité de l'essai après agitation (DO_e) et du témoin (DO_t).

$$A\% = 100 \times (DO_t - DO_e) / DO_t$$

3.1.3. Numération des bactéries cultivables sur milieu gélosé

La numération des bactéries cultivables s'effectue en répartissant 1mL de la suspension bactérienne dans 9mL de sérum physiologique stérile (solution de NaCl à 9g L^{-1} autoclavé). Les dilutions successives sont pratiquées de 10 en 10. 0,1mL de suspension diluée est déposé sur une gélose nutritive complémentée en naphthalène (§3.1.1) dans une boîte de Pétri puis étalé avec une pipette râteau. L'incubation des géloses est réalisée boîtes retournées à une température de 30°C pendant 72 heures. Après la période d'incubation, les unités formant colonies (UFC) sont comptées. *Burkholderia cepacia* se présente sous forme de petites colonies circulaires et blanches. Les résultats sont exprimés en UFC mL^{-1} de suspension bactérienne pure.

3.1.4. Numération du nombre total de bactéries

Le comptage du nombre total de bactéries (vivantes et mortes) consiste en une observation au microscope sous lumière UV des bactéries colorée au Dapi (4,6-diamino-phénylindol, Sigma D1388).

Une solution mère de Dapi est préparée dans de l'eau Milli-Q filtrée sur un filtre de 0,22 μm de porosité (Millipore Millex GS) à une concentration finale de 25 $\mu g mL^{-1}$. La solution mère est conservée au maximum pendant 8 jours à l'obscurité à 4°C. Au-delà de cette limite, la solution mère est conservée par congélation en tubes de 10mL.

Le marquage de l'échantillon est réalisé par ajout dans un tube stérile de 12mL en matière plastique (Labo Express) de 1mL de la solution mère de Dapi à 25 $\mu g mL^{-1}$ et 9mL de suspension bactérienne afin d'obtenir une concentration finale en Dapi de 2,5 $\mu g mL^{-1}$. Le tube est agité

manuellement et la suspension bactérienne est laissée en contact avec le réactif pendant 15 minutes à la température du laboratoire.

Le mélange est ensuite filtré à travers un filtre noir en polycarbonate de 0,22 μ m de porosité (GTBP Millipore). Le filtre est ensuite monté entre lame et lamelle avec une goutte de glycérine et de l'huile à immersion pour épifluorescence. Un échantillon de 9mL d'eau Milli-Q sur un filtre de 0,22 μ m de porosité (Millipore Millex GS) est analysé selon le même protocole et sert de témoin.

L'observation au microscope s'effectue sous lumière ultraviolette avec l'objectif à immersion de 100 (grossissement x1000), au travers d'un réticule monté dans l'oculaire. Le comptage de bactéries apparaissant avec une fluorescence bleue se fait sur 10 champs répartis au hasard sur l'ensemble du filtre à travers le réticule quadrillé.

Le nombre de bactéries N , tient compte de la surface utile du filtre (S_f en mm^2) et de la surface observée sous le réticule (S_r en mm^2) est donnée par la formule suivante.

$$N = [X.S_f / V.S_r \pm \sigma_x.S_f / V.S_r] \times \text{dilution}$$

avec N = Nombre de bactéries par ml de suspension, X = Moyenne du nombre de bactéries comptées sur 10 champs, V = Volume de l'échantillon et σ_x : Ecart-type à la moyenne

3.2. Milieu minéral

Un milieu minéral est réalisé de façon à avoir un pouvoir tampon et de façon à respecter un rapport C/N/P au moins égal à 10/2/1 nécessaire à la croissance bactérienne. Les quantités de N et de P ajoutées sont calculées par rapport à une concentration en naphthalène de 30 mgL^{-1} correspondant à 28 mgL^{-1} en carbone (Solubilité du naphthalène dans l'eau = 30 mgL^{-1} à 25°C).

Pour la réalisation de 1 litre de milieu minéral tamponné, sont ajoutés à 1 litre d'eau Milli-Q (Millipore), 20mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Prolabo), 10 mg de K_2HPO_4 (Prolabo), 40mg de NH_4Cl (Prolabo), et 1mL de la solution mère d'éléments minéraux.

La solution mère d'éléments minéraux est réalisée par dissolutions successives dans 1 litre d'eau Milli-Q (Millipore) de 0,1g de H_3BO_4 , 0,04g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,045g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,04g de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, et de 0,025g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La solution est stérilisée par filtration (afin d'éviter les précipitations durant l'autoclavage) sur filtres 0,22 μ m (Millipore Millex GS). Elle est conservée dans des tubes plastiques stérile de 10mL (LaboExpress) à 4°C.

Le pH est vérifié égal à 7. La solution finale a une force ionique de 1,1 mmolL^{-1} .

3.3. Milieu naphthalène

Le milieu naphthalène préparé dans le milieu minéral (§3.2) est réalisé par ajout de 50mgL⁻¹ de naphthalène solide (Sigma). La solution contenant des cristaux est ensuite stérilisée autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. La concentration initiale de naphthalène supérieure à la solubilité permet de compenser les pertes par volatilisation durant l'autoclavage. La concentration exacte est mesurée après refroidissement par HPLC (§3.6).

3.4. Préparation des supports adsorbants

Quatre types de supports sont employés : un matériau minéral (montmorillonite sodique), deux argiles organiques (complexe montmorillonite/polyacrylamide et B34) et un sédiment naturel. Le tableau 3.1 reprend quelques caractéristiques des divers matériaux.

Tableau 3.1. Caractéristiques des supports adsorbants

	Na- montmorillonite	Complexe montmorillonite/ polyacrylamide (44000)	Argile organique B34	Sédiment
CEC (meq/100g) ⁽¹⁾	95	-	-	12,55
Surface (m ² g ⁻¹) ⁽²⁾	50	-	7	3,8
CO (%) ⁽³⁾	<0,1	18,5	27	2
pH ⁽⁴⁾	6,8	6,8	6,8	7,3
Minéraux	Si ₄ Al _{1,75} Mg _{0,25} O ₁₀ (OH) ₂ Na _{0,25}	montmorillonite	bentonite	quartz, kaolinite, mica, feldspath
Granulométrie (µm) ⁽⁵⁾	0,75	1,5	80	23

(1) Capacité d'échange cationique dosée par échange du sodium par du calcium (montmorillonite) et cobalthexamine (sédiment) (Centre de Pédologie Biologique, Vandoeuvre)

(2) Méthode au BET (adsorption de gaz N₂) pratiqué par le Laboratoire Environnement Minéralurgie (Vandoeuvre)

(3) Calcination à 1100°C pratiqué par le Centre de Pédologie Biologique (Vandoeuvre)

(4) mesuré pour des suspensions à 1gL⁻¹ dans le milieu minéral (§3.1)

(5) Diamètre volumique moyen des particules en suspension mesuré en diffraction Laser (Mastersizer, Malvern) (LEM, Vandoeuvre)

3.4.1. Montmorillonite sodique

La montmorillonite utilisée est de la montmorillonite naturellement homoionique sodique, Crook County provenant du Wyoming (Etats-Unis) et commercialisée par l'Université du Missouri-Columbia.

Le protocole de purification et d'échange d'ions de la montmorillonite pour un échange complet des cations par du sodium, proposé ci-après est emprunté à Bruant (1986).

Afin de la débarrasser de ses impuretés qui sont essentiellement du quartz et des feldspaths, 40g de montmorillonite sont dispersés avec un agitateur magnétique dans un litre de NaCl $10^{-2}M$ pendant environ 2 heures. La suspension est centrifugée dans une centrifugeuse Centrikon T-24 (Kontron) à $20000g$ à $20^{\circ}C$ pendant 40 minutes. Les 2 couches supérieures du culot correspondant à l'argile (la couche supérieure est un gel de couleur beige translucide et la seconde couche est mâte) sont remises en suspension sous agitation magnétique dans 2 litres d'une solution de NaCl $1M$ pendant 72 heures. Cette étape a pour objet de rendre homoionique l'argile par un échange de sodium.

La montmorillonite est alors débarrassée de l'excès de sel par au moins 5 lavages successifs à l'eau Milli-Q (Millipore) : mise en suspension dans 1 litre d'eau Milli-Q, agitation magnétique pendant 3 heures, centrifugation pendant 40 minutes à $20000g$ à $20^{\circ}C$.

Le surnageant de la dernière centrifugation est récupéré pour un contrôle des ions chlorure. Quelques gouttes de $AgNO_3$ ($0,05M$) sont ajoutées au surnageant. La formation d'un précipité de chlorure d'argent met en évidence la présence de chlorures dans le surnageant indiquant la nécessité d'effectuer d'autres lavages pour éliminer les ions chlorure restants (Ogawa *et al.*, 1992).

La montmorillonite séchée à l'étuve à $105^{\circ}C$ est conservée dans un dessiccateur à la température du laboratoire. La figure 3.1 est une schématisation d'un feuillet de montmorillonite et la formule brute de la maille élémentaire est : $Si_4 Al_{1,5} Mg_{0,25} O_{10} (OH)_2 Na_{0,25}$

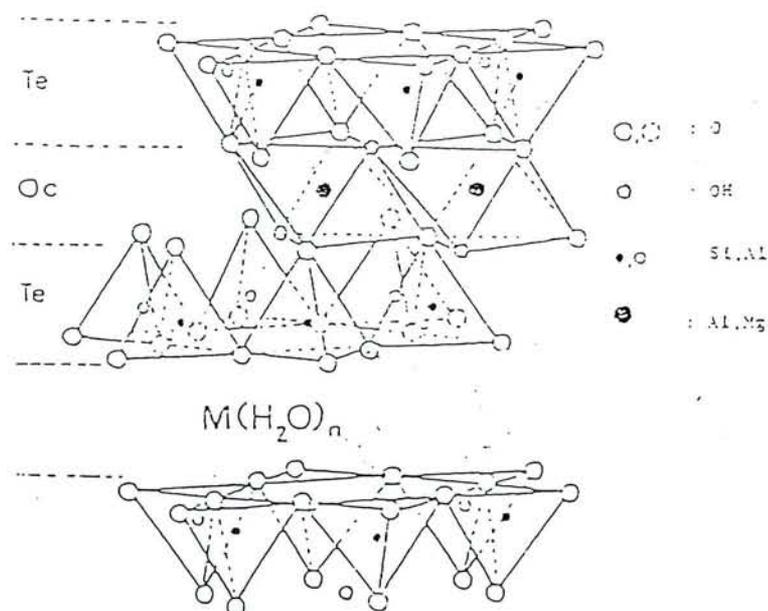


Figure 3.1. Représentation schématique d'un feuillet de montmorillonite constitué de 2 couches tétraédriques et d'une couche octaédrique (d'après Bruant, 1986)

3.4.2. Complexe montmorillonite sodique / polyacrylamide neutre

Le complexe montmorillonite/polyacrylamide a été conçu pour obtenir un matériau organo-minéral non altérable par les microorganismes, le polymère n'étant pas biodégradable.

un g de montmorillonite sodique purifiée (§3.4.1) est ajouté à 1 litre de solution à $1,8\text{gL}^{-1}$ et à $1,4\text{gL}^{-1}$ de polyacrylamide neutre (de masse moléculaire $2,5 \cdot 10^6$ et 44000 respectivement, Hoechst) préalablement dispersés dans de l'eau Milli-Q (Millipore) pendant 24 heures sous agitation lente. Ces concentrations correspondent à celles utilisées par Bruant (1986) (Annexe1). La suspension est agitée par barreau magnétique pendant 24 heures à température ambiante puis centrifugée à 20000g pendant 40 minutes à 20°C . Le culot est repris dans de l'eau Milli-Q (Millipore) 2 fois et la montmorillonite contenant le polymère adsorbé est conservée dans des flacons stériles après lyophilisation. Le carbone organique dissous des surnageants de centrifugation récupérés et dosés (§3.5) de façon à évaluer par différence, la quantité de polyacrylamides fixés sur la montmorillonite. Pour le polyacrylamide de masse moléculaire 44000, la quantité adsorbée est de 455 mgg^{-1} de montmorillonite et 555mg de polyacrylamide de PM $2,5 \cdot 10^6$ de montmorillonite (Annexe 1). Les valeurs trouvées correspondent à celles de Bruant (1986).

La figure 3.2 donne la formule brute du motif du polyacrylamide neutre et la figure 3.3 une représentation schématique du complexe montmorillonite/polycarylamide.

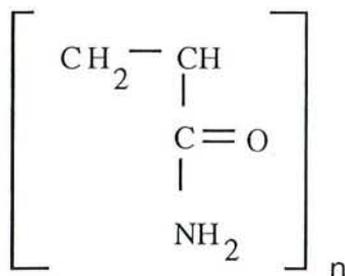


Figure 3.2 : Motif du polymère polyacrylamide neutre

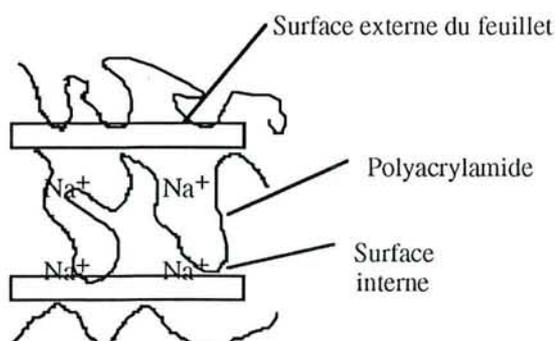


Figure 3.3. Schématisation du complexe : polymère adsorbé sur la montmorillonite de sodium

3.4.3. Argile organique (montmorillonite + tensioactif) B34

L'argile organique B34 est une montmorillonite sodique échangée par du diméthyl-distéaryl ammonium ($[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}]_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{Br}^-$) fournie par le Laboratoire Environnement Minéralurgie (Vandoeuvre). Elle a été choisie pour ses propriétés hydrophobes permettant le piégeage du naphthalène avec les chaînes carbonées du tensioactif. Cette argile est lavée au méthanol de façon à éliminer les molécules de tensioactif sur les feuillets externes de l'argile.

1g de B34 est placé dans 100mL de méthanol pour analyses (Labosi) et maintenu sous agitation magnétique pendant 10 minutes. La suspension subit une décantation pendant 10 minutes et le surnageant (méthanol) est éliminé par évaporation à 30°C. La bentonite est alors séchée à 30°C (± 1) pendant 48 heures et conservée dans un dessiccateur à température du laboratoire.

Un dosage du carbone organique par calcination à 1100°C (réalisé par le Centre de Pédologie Biologique, Vandoeuvre) révèle un contenu organique après lavage de 27%, correspondant à 326mg de tensioactif g^{-1} d'argile.

Les travaux de Katib (1994) ont montré qu'à l'état sec, les particules de B34 sont constituées d'un empilement de 10 feuillets avec deux groupes de distances : des distances correspondant aux divers angles d'inclinaison des chaînes alkyles du surfactant dans l'espace interfoliaire et une distance correspondant au paquet de molécules organiques qui sont restées à l'extérieur de l'espace interlamellaire. La structure de la montmorillonite comprenant du tensioactif peut être schématisée comme sur la figure 3.4.

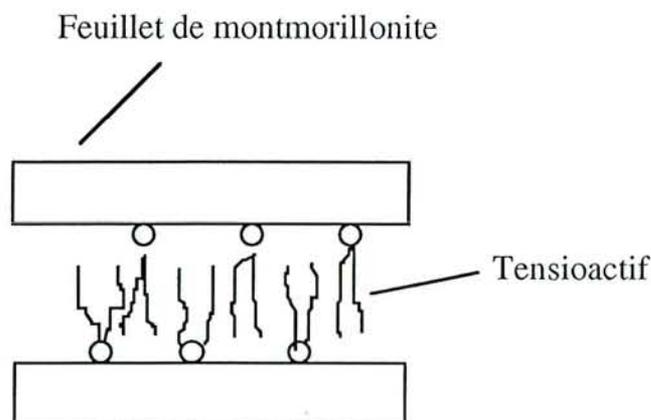


Figure 3.4. Schématisation de la structure de la montmorillonite comprenant du tensioactif entre les feuillets de montmorillonite (d'après Katib, 1994)

3.4.4. Sédiment

Le sédiment provient de la rivière Bièvre (Sarrebouurg, France). Il a subi une pollution organique due à la présence de raffinerie et de cookerie en amont du site de prélèvement. L'échantillon (prélèvement effectué en été (juin 1994)) a été fourni après séchage et tamisage (fraction inférieure à 250 μ m représentant 95% de la fraction globale) par le LEM (Vandoeuvre). Les polluants retrouvés sont surtout des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, quelques phénols et des acides carboxyliques. Le sédiment relargue du carbone après remise en suspension dans une phase aqueuse (3mgCg⁻¹ de sédiment) (Les résultats sont exposés en Annexe 6).

3.5. Dosage du carbone organique dissous (COD)

Le dosage du carbone organique dissous (COD) est réalisé à l'aide d'un analyseur Dohrmann DC 80, étalonné avec une solution de phtalate acide de potassium (Prolabo) à 10mgL⁻¹ de carbone.

Tous les tubes destinés à prélever les échantillons sont débarrassés du carbone par passage au four à 550°C pendant 4 heures. La verrerie autre que les tubes est nettoyée par trempage pendant 12 heures dans de l'acide nitrique à 68% (Normapur, Prolabo) dilué au tiers avec de l'eau Milli-Q (Millipore). La verrerie est ensuite rincée 3 fois à l'eau Milli-Q et séchée à l'abri de la poussière.

Les échantillons (environ 10mL) recueillis dans des tubes débarrassés de leur carbone sont filtrés à travers un filtre (Millipore GVWP 02500) de 0,22 μ m de porosité rincé avec 100mL d'eau Milli-Q (Millipore), puis acidifiés avec 50 μ L d'acide nitrique (Merck). Les échantillons sont ensuite soumis au bullage à l'oxygène ultrapur (Prodair) pendant 5 minutes pour éliminer le carbone minéral. L'échantillon est alors injecté dans l'appareil et chaque mesure est réalisée en duplicat.

3.6. Dosage du naphthalène

Le dosage du naphthalène est réalisé par chromatographie liquide haute performance (HPLC) Kontron avec détection UV à 275nm (pic maximum observé sur le spectre de la figure 3.5, et en accord avec les mesures de Wodinski et Bertolini (1972)). Les concentrations de 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,1mgL⁻¹ pour la courbe d'étalonnage sont préparées par dilution dans un mélange méthanol / eau Milli-Q (90/10) d'une solution mère de naphthalène à 1g⁻¹ dans du méthanol.

Les conditions analytiques de dosage après mise au point de la méthode sont l'utilisation d'une colonne C18 phase inverse de 25cm de longueur, d'une phase mobile méthanol/eau (90/10

volume/volume) dégazée à l'hélium, à un débit de $0,7\text{mLmin}^{-1}$ à une température de la colonne régulée à 30°C . Le volume de l'échantillon injecté est de $20\mu\text{L}$.

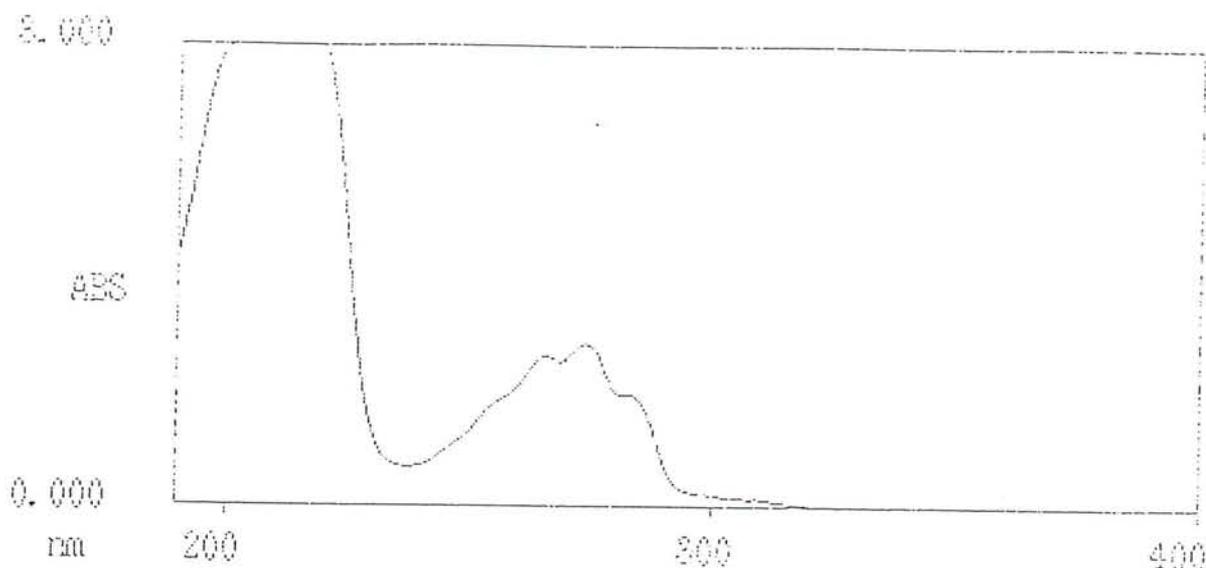


Figure 3.5 : Spectre d'absorption UV visible du naphthalène dans le mélange méthanol/eau (spectrophomètre Hitachi U2000)

3.7. Extraction du naphthalène adsorbé

Le naphthalène sorbé sur l'argile organique B34 est extrait par du méthanol et dosé de façon à quantifier la fraction de naphthalène sorbé.

10mL de suspensions de B34 ou de montmorillonite dans des tubes de 10mL sont centrifugés à $45000g$ pendant 10 minutes. Le surnageant aqueux est entièrement éliminé et remplacé par le même volume d'un mélange méthanol/eau à 90/10. Le culot est remis en suspension par une agitation au vortex de 30 secondes, laissé au repos pendant 15 minutes, agité de nouveau pendant 30 secondes puis centrifugé à nouveau à $45000g$ pendant 10 minutes. Le naphthalène alors extrait et présent dans le surnageant (rendements d'extraction compris entre 95 et 100%) est dosé par HPLC (§3.6)

3.8. Dosage des cations (NH_4 , K, Na, Fe, Cu, Zn et Mn)

Les cations en solution ont été dosés par le Laboratoire d'Hygiène et de Recherche en Santé Publique de façon à quantifier la quantité échangée avec le sodium de la montmorillonite.

Les dosages du sodium et du potassium ont été réalisés en chromatographie ionique, les ions ammonium, par la méthode normalisée au réactif de Nessler (NF T90 015), le fer par absorption atomique et le cuivre, zinc et manganèse par ICP MS.

Les limites de détection pour chaque élément sont données dans le tableau 3.2.

Tableau 3.2. Limites de détections des dosages de cations

Na	K	NH ₄	Fe	Cu	Zn	Mn
0,5mgL ⁻¹	0,5mgL ⁻¹	0,5mgL ⁻¹	5µgL ⁻¹	5µgL ⁻¹	5µgL ⁻¹	1µgL ⁻¹

Une autre méthode a été utilisée pour le dosage des ions ammonium. C'est une méthode colorimétrique développée et mise en oeuvre par Fass *et al.* (1994).

Le principe consiste à combiner les composés ammoniacaux avec le chlore pour former des monochloramines. Ces monochloramines se combinent elles-mêmes avec le salicylate pour former le 5-aminosalicylate. Ce composé (jaune) est alors oxydé en présence d'un catalyseur au nitroprussiate, pour former un complexe coloré bleu. La coloration bleue est masquée par la coloration jaune en excès pour donner une solution finale colorée en vert. Le dosage est réalisé par spectrophotométrie à 655nm.

Le kit de dosage réactif chlore/salicylate (Hach 21460-68) est alors versé dans un tube contenant un volume final de 25mL. Il est agité sur agitateur vibrant pendant 30 secondes. Après 3 minutes de repos, le réactif cyanurate alcalin (Hach 21462-66) est versé dans le tube, agité à nouveau 30 secondes. Après 10 minutes de repos, l'absorbance du complexe coloré est mesurée à 655nm. La concentration de l'échantillon est déterminée à l'aide d'une gamme étalon préalablement établie pour des concentrations en ions ammonium de 0,1 à 1mgN-NH₄⁺L⁻¹.

3.9. Méthode d'ensemencement des essais de biodégradation

L'ensemencement des réacteurs est réalisé de façon à obtenir une croissance bactérienne (dégradation du naphthalène dans milieu minéral (§5.1)) ou de minimiser cette croissance (essais de biodégradation du naphthalène en présence de particules (Chapitre 5)).

Pour négliger la croissance bactérienne, le rapport concentration initiale en substrat / concentration initiale en bactéries noté S_0/X_0 exprimé en mg de DCO (demande chimique en oxygène) par mg de matières sèches (bactéries) doit être inférieur à 2 (Chudoba *et al.*, 1991). Sachant que la quantité maximale de naphthalène dans 100mL d'essai est de 3mg, la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation de 3mg de naphthalène est de alors 9mg d'O₂ d'après l'équation d'oxydation théorique du naphthalène



Pour un S_0/X_0 inférieur à 2mg de DCOmg⁻¹ de MES, la concentration X_0 doit être inférieur à 4,5 mg de matières sèches (MES) soit 2,5.10¹⁰ bactéries pour 100mL (volume de l'essai) (masse d'une bactérie ≈ 0,2.10⁻¹²).

Une concentration minimale de 10^8 bactéries par mL est à introduire pour négliger la croissance. Inversement, une concentration bactérienne très inférieure à 10^8 bactéries mL^{-1} permettra une croissance cellulaire.

Des colonies bactériennes repiquées sur milieu solide à base de naphthalène à base de naphthalène (§3.1) et âgées de 72 heures sont prélevées à l'aide d'une öse et mises en suspension dans un tube contenant 10mL de solution tampon de naphthalène (§3.2) stérile. Le tube est agité fortement par passage au Vortex pendant 60 secondes puis est transféré dans un ballon contenant 50mL de solution de naphthalène stérile (§3.2). La suspension est agitée à 30°C pendant 12 heures de façon à adapter les microorganismes au naphthalène. 5mL de suspension bactérienne sont prélevés introduits près de la flamme dans les réacteurs des essais de biodégradation.

3.10. Observations en microscopie électronique

3.10.1. Microscopie électronique à balayage

Des aliquots de a) la suspension de montmorillonite à $0,5\text{gL}^{-1}$, b) de la suspension bactérienne de *Burkholderia cepacia* et c) du mélange de montmorillonite et de bactéries sont déposés sur des filtres de $0,45\mu\text{m}$ de porosité (Millipore HAWG03700). Les filtres sont séchés sous vapeurs d'osmium (Euromedex) et examinés sous vide avec un microscope électronique à balayage (Hitachi S2500).

De plus, des spectres électroniques de surface sont réalisés avec un spectromètre EDF KeveX.

3.10.2. Microscopie électronique à transmission

Des coupes de suspensions bactériennes et organo-minérales sont réalisées de façon à observer en microscopie électronique à transmission, l'organisation et l'agencement des bactéries vis-à-vis des particules solides. Ces observation ont été réalisées avec l'aide de G. Villemin du CPB (Vandoeuvre).

Les observations ont été faites sur une suspension de bactéries (*Burkholderia cepacia*) à 10^7 UFC mL^{-1} , de montmorillonite ($0,5\text{gL}^{-1}$), de complexe montmorillonite + polyacrylamide ($0,25\text{gL}^{-1}$), d'argile organique B34 (50gL^{-1}), de sédiment (1gL^{-1} et 50gL^{-1}), de mélange montmorillonite et bactéries, complexe + bactéries, argile organique B34 + bactéries et de sédiment + bactéries.

La préparation des échantillons est réalisée en plusieurs étapes successives : fixation chimique, fixation physique, déshydratation, inclusion dans la résine, coupes et observations.

La fixation à l'osmium (solution à 4%, Euromedex) a pour but de stabiliser l'ultrastructure des composants organiques par création de liaisons entre toutes les molécules possédant des doubles liaisons carbonées. 10mL de suspension agités (par barreaux magnétique) de chaque échantillon sont placés dans un système hermétique contenant des vapeur d'Osmium pendant une nuit (environ 15 heures).

Les échantillons sont ensuite pris dans l'agar (Merck) dans des boîtes de Pétri (Ø 50) par ajout volume pour volume d'agar (Merck) porté à ébullition et ramené à 45°C (concentration finale de 20g L^{-1}) et de suspension. Le mélange est homogénéisé et solidifié par refroidissement rapide à 4°C avant de procéder à la dessiccation.

Des cubes de 1mm³ sont découpés au scalpel dans l'agar solidifié et placés dans des tubes de verre de 3mL (Venoject) puis subissent une dessiccation par bains successifs de mélanges acétone/eau : 1 bain de 5min dans un mélange 10% d'acétone, 1 bain de 5min dans un mélange 20%, 1 bain de 5min dans un mélange 30%, 1 bain de 5 min dans un mélange 40%, 1 bain de 5min dans un mélange 60%, 1 bain de 15min dans un mélange 80%, 2 bains de 15min dans un mélange 95%, puis enfin 3 bains de 20min dans de l'acétone pure (Analyapur, Labosi) exempte d'eau (présence de silicagel sans chlorure de Cobalt (Fluka)).

Les échantillons subissent ensuite une imprégnation dans des bains successifs à concentration constante en résine Epoxy. La résine Epoxy est constituée d'un mélange de 45% de Polarbed 812 (Euromedex), 31% de DDSA (Euromedex), de 23% de MNA (Euromedex) et de 1% de DMP30 (Euromedex). Les proportions croissantes de résine sont de 1/3 (temps de contact : 12h sous vide), puis 2/3 (temps de contact : 12h sous vide), et enfin dans la résine pure (temps de contact : 12h).

Les échantillons sont alors moulés et la résine est polymérisée à l'étuve à 60°C pendant toute une nuit dans une atmosphère dépourvue d'eau (*ie* en présence de silicagel). Des coupes d'une épaisseur de 80-100nm sont alors réalisées avec un microtome (OMU2, Reichert) sur les échantillons démoulés et observées en microscopie électronique à transmission (Phillips).

3.10.3. Colorations spécifiques des coupes pour la MET

3.10.3.1. Coloration de contraste

Cette coloration au citrate de plomb et acétate d'uranyle a pour but d'augmenter le contraste de l'échantillon avant observation.

La préparation du citrate de plomb est réalisée d'un mélange constitué de 1,33g nitrate de plomb et de 1,76g de citrate de sodium dans 30mL d'eau distillée est agité pendant 1 minute. Le mélange se trouble et est alors laissé au repos pendant 30 minutes. 8mL de soude normale est ajoutée au mélange qui devient limpide et le volume est complété à 50mL avec de l'eau distillée.

L'acétate d'uranyle est réalisé par dissolution de 2 g d'acétate d'uranyle dans 50mL d'acide acétique à 1%. Un volume de 49mL de cette solution est complété à 100mL par de l'alcool absolu.

Une boîte de Pétri contenant des pastilles de soude (absorption du CO₂) contient un morceau de parafilm sur lequel sont disposées des gouttes de colorant (citrate de plomb et acétate d'uranyle). Les grilles sont placées sur ces gouttes, la face portant les coupes en contact avec le liquide. Après réaction (15 à 20 minutes pour l'acétate d'uranyle et 10 à 15 minutes pour le citrate de plomb) les grilles sont lavées avec de l'eau distillée, puis séchées sur papier filtre.

3.10.3.2. Mise en évidence des protéines

La réaction utilisée met en évidence les protéines renfermant la cystine (acide aminé soufré).

Le réactif est préparé en mélangeant au moment de l'emploi 25mL d'une solution constituée de 100mL méthanémine à 3% et 5mL de nitrate d'argent à 5%, avec 5mL d'une solution contenant 10mL d'acide borique à 1,44% et 100mL de borax à 1,9% et avec 25mL d'eau distillée.

Les coupes sont recueillies sur des grilles en or. Les grilles sont immergées dans le réactif et placés à 45°C à l'étuve dans de l'obscurité pendant 2 heures. Après avoir réalisé plusieurs lavages soigneux à l'eau distillée, les grilles séchées peuvent être observées au microscope électronique.

3.14.3.3. Mise en évidence des polysaccharides (réaction de Thiery)

La réaction de Thiery est une réaction spécifique des polysaccharides. Elle est l'application à la microscopie électronique de la réaction acide périodique-Schiff de la microscopie photonique. Elle se pratique sur coupes minces disposées sur des grilles en or, l'acide périodique attaquant le cuivre.

Dans un premier temps, l'échantillon subit une oxydation par l'acide périodique à 1% dans l'eau distillée pendant 30 minutes. L'acide périodique attaque les liaisons α 1-4 et β 1-4 et non les liaisons 1-3.

Après un lavage soigneux à l'eau distillée des coupes, les grilles sont mises à flotter sur une solution de thiocarbohydrazide à 0,2% dans l'acide acétique à 20% pendant 5 heures. Les grilles sont ensuite lavées (2 fois 5 minutes) dans de l'acide acétique à 20%, 15%, 10%, 5% et dans de l'eau distillée. Les grilles sont enfin placées dans du protéinate d'argent à 1% dans l'eau distillée pendant 30 minutes à l'obscurité à la température du laboratoire.

Après un lavage soigneux à l'eau distillée, les grilles peuvent être observées en microscopie électronique.

3.11. Modèles

Les résultats expérimentaux ont été modélisés à l'aide d'équations mathématiques empruntées à la littérature pour faciliter la comparaison directe des résultats. Ces modèles ont été développés dans le chapitre 2 Analyse Bibliographique.

3.11.1. Cinétiques d'adsorption et de désorption

L'équation de Langmuir définissant une cinétique d'adsorption ou de désorption est la plus souvent employée. Elle s'écrit de la façon suivante (§2.4.2.3) :

$$dQ/dt = k_1.C.(Q_m-Q) - k_2.Q$$

Après intégration, l'équation devient :

$$Q = Q_m (1 - \exp(-k_1.t)) \text{ pour l'adsorption}$$

$$Q = Q_m (1 - \exp(-k_2.t)) \text{ pour la désorption}$$

k_1 : Constante cinétique d'adsorption (T^{-1})

k_2 : Constante cinétique de désorption (T^{-1})

Q_m : Quantité maximale adsorbée (MM^{-1})

Q : Quantité de composé adsorbé (MM^{-1})

C : Concentration du composé dans la phase liquide (ML^{-3})

3.11.2. Isothermes d'adsorption et de désorption

Les deux modèles les plus souvent rencontrés dans la littérature sont appliqués aux isothermes d'adsorption et de désorption. Ces deux modèles sont Freundlich et Langmuir. Ils ne décrivent pas une sorption du même type : le modèle défini par Langmuir fait l'hypothèse d'une capacité maximale de sorption, c'est-à-dire que l'adsorbant peut être saturé. Le modèle de Freundlich, quant à lui, fait l'hypothèse d'une capacité d'adsorption infinie (Fetter, 1993, Schwarzenbach *et al.*, 1993).

L'équation de Langmuir (§2.4.2.3) s'écrit : $Q_e = Q_m.b.C_e / 1+b.C_e$

L'équation de Freundlich (§2.4.2.3) s'écrit : $Q_e = K.C_e^n$

avec : Q_e : Quantité de composé adsorbé à l'équilibre (MM^{-1})
 Q_m : Quantité maximale pouvant s'adsorber sur le solide (MM^{-1})
 C_e : Concentration du composé dans la phase liquide à l'équilibre (ML^{-3})
 b : Rapport entre la constante cinétique d'adsorption et de désorption (k_1/k_2) (Langmuir)
 K : Constante de distribution entre la phase liquide et la phase solide (L^3M^{-1})
 n : Paramètre de non linéarité de la courbe

Un cas particulier de la modélisation de Freundlich où $n=1$ est souvent employé. L'équation devient $Q_e = K.C_e$ et modélise une droite. Il s'agit alors d'un partage entre deux phases et la constante de partage est généralement notée K_p .

3.11.3. Volatilisation

La volatilisation du naphthalène est modélisée par une cinétique de disparition du premier ordre :

$$C = C_i \exp(-k.t)$$

où C_i représente la concentration initiale de naphthalène et où k représente la constante cinétique de volatilisation (T^{-1}).

3.11.4. Déduction de la volatilisation

La prise en compte de la volatilisation dans les cinétiques d'adsorption est obtenue en ajoutant la perte de naphthalène dans le témoin.

Par contre, la cinétique de biodégradation est obtenue en corrigeant les valeurs mesurées de la constante de volatilisation du premier ordre.

$$C_{\text{volatilisation}} = C_{\text{mesurée}} - k_{\text{volatilisation}} \int f(C_{\text{mesurée}})$$

$f(C_{\text{mesurée}})$: modélisation de la cinétique par un polynôme du troisième degré

3.11.5. Cinétiques de biodégradation

Deux calculs sont réalisés pour apprécier les taux de dégradation du naphthalène par *Burkholderia cepacia*, un calcul de vitesse maximale et une constante cinétique.

1) La vitesse maximale observée est calculée par la pente de la courbe la plus forte entre deux points expérimentaux (volatilisation prise en compte).

2) Les cinétiques de biodégradation déduites de la volatilisation sont modélisées selon une cinétique de consommation du naphthalène du premier ordre (Simkins and Alexander, 1984).

$$C = C_i \exp(-k.t)$$

où C_i représente la concentration initiale de naphthalène à dégrader et où k représente la constante cinétique de dégradation (T^{-1}).

3.11.6. Calcul de la diffusivité du naphthalène à une température donnée

La diffusivité d'un composé suit une loi de Stokes-Einstein et est fonction de la température et de l'inverse de la viscosité (Robinson et Stokes, 1959, cités par Mignot et Junter, 1990). Ainsi la valeur de diffusivité peut être approchée par :

$$D = kT / (6\pi\eta r)$$

avec D diffusivité à la température T en Kelvin, k constante de Boltzmann ($k = 1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), η viscosité du milieu à la température T ($\eta = 797,7 \mu\text{Pa s}$ à 30°C) et r rayon du diffusant.

Ainsi, la diffusivité du naphthalène à 25°C vaut $7,24 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à 25°C (Hayduk et Minhaus 1981, cités par Mihelcic et Luthy, 1991) devient $7,38 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ à une température de 30°C .

3.11.7. Diffusion dans la couche limite

En se basant sur une diffusion dans la couche limite, limitante de la désorption du naphthalène (pour B34) ou de sa biodégradation (pour B34 et montmorillonite), il est possible de calculer de façon théorique les constantes cinétiques du premier ordre qui doivent correspondre aux valeurs des constantes mesurées expérimentalement.

Le flux de composé transféré par diffusion Φ peut être approximé par la première loi de Fick :

$$\Phi = dC/dt = -D_e dC/dz$$

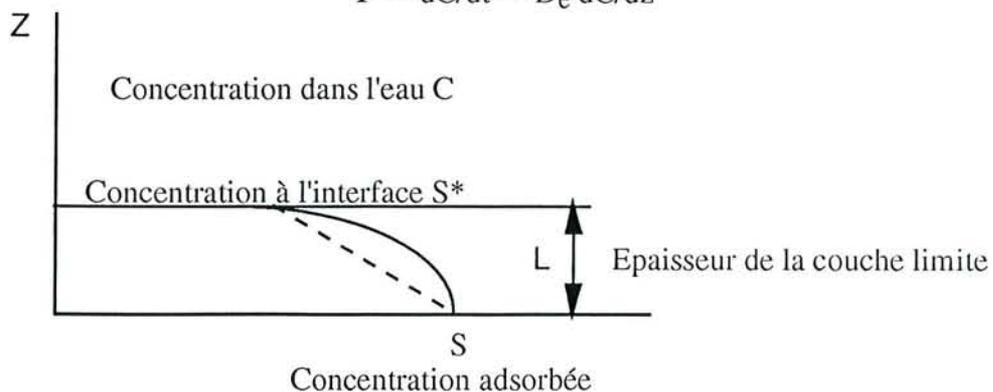


Figure 3.6. Représentation schématique de la couche limite d'épaisseur L

Le gradient dC/dz peut être estimé par un gradient linéaire dans la couche limite (Figure 3.6) et la loi de Fick s'écrit alors :

$$\Phi = -D_e (S^* - S) / L$$

Considérons un équilibre linéaire entre la phase solide et la phase liquide :

$$S = K_p C, \text{ alors}$$

$$\Phi = D_e (K_p C - S) / L$$

Or le flux de molécules désorbées (ou biodégradées) peut se traduire comme une quantité de molécules désorbées (ou biodégradées) à une vitesse suivant une loi du premier ordre par unité de surface pour un volume de particules présentes dans la solution.

$$\Phi = k n V / A$$

Après simplification volume/surface :

$$\Phi = k (K_p C - S) d_v / 6$$

Par égalisation des deux flux

$$k = 6 D_e / d_v L$$

avec D_e diffusivité dans la phase eau ($D_e = 7,38 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ pour le naphthalène à 30°C , §3.11.6), L l'épaisseur de la couche limite, C concentration dans la phase eau, S^* concentration à l'interface, S concentration adsorbée, K_p la constante de partage entre la phase aqueuse et la phase solide, k constante cinétiques de désorption du premier ordre, n , nombre de molécules désorbées, V volume des particules, A surface des particules et d_v est le diamètre moyen volumétrique des particules.

Rijnaarts *et al.*, (1990) ont par ailleurs utilisé cette équation $k = 6 D_e / d_v L$ pour calculer l'épaisseur de la couche limite de diffusion.

3.11.8. Calcul de la diffusivité du naphthalène à travers une membrane

La méthode de calcul de la diffusivité du naphthalène à travers une membrane est empruntée à Mignot et Junter (1990). Le flux du composé transféré est directement proportionnel à la diffusivité qui peut être approximée par la formule suivante :

$$D = A^{-1} L K_p^{-1} C_i^{-1} \Phi$$

avec A : Surface de la membrane, L : épaisseur de la membrane, K_p : constante de partage du naphthalène entre la phase eau et la membrane, C_i : concentration initiale en naphthalène dans la cellule 1 et Φ le flux de naphthalène transféré calculé par la pente de la droite

3.11.9. Calcul de la diffusivité intraparticulaire du naphthalène

La diffusivité intraparticulaire du naphthalène D_{eff} peut être approximée grâce à la formule développée par Wu et Gschwend (1986).

$$D_{eff} = (D_e n^2) / \{(1-n)\rho_s K_p\}$$

avec D_e diffusivité du naphthalène dans l'eau à 30°C ($7,38 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), n la porosité du solide, ρ_s la densité du solide et K_p le coefficient de partage du naphthalène entre l'argile organique et l'eau.

3.12. Chambres de mesure de diffusion

Les expériences de diffusion du naphthalène à travers une membrane sont réalisées dans un appareillage en verre calqué sur celui de Junter et Mignot (1990). L'appareillage est constitué de 2 cellules de 1012mL exactement. Chaque cellule est constituée d'un cylindre de 10cm de diamètre et de 12,7cm de long qui est muni de deux ouvertures bouchées par des septum Téflon (Figure 3.7) par lesquelles sont effectués les prélèvements. Les deux cellules sont séparées par une membrane en fluorure de polyvynilidène de 0,22 μm de porosité (Millipore GVWP 02500) de surface 12,56cm². Les deux cellules sont maintenues l'une contre l'autre par serrage, aucun joint n'étant présent de part et d'autre de la membrane. Chaque cellule est agitée par 2 barreaux magnétiques recouverts de téflon de 1cm de longueur.

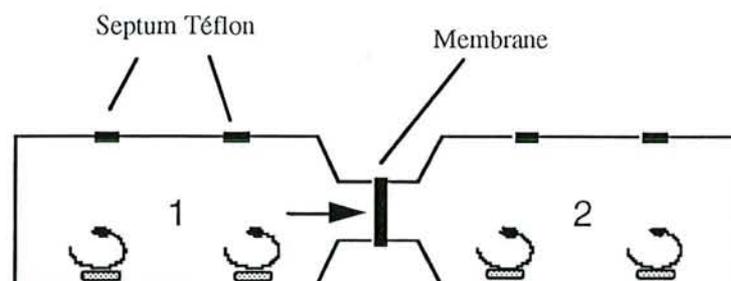


Figure 3.7. Cellules de mesure de diffusion (1012mL) à travers une membrane

3.13. Références bibliographiques

- BRUANT M., 1986,
Etude de la déstabilisation de suspensions de montmorillonite par des polymères organiques et inorganiques,
Thèse de l'INPL, soutenue à Vandoeuvre le 28 octobre 1986, 218 pages.
- CHUDOBA P., J. CHANG and B. CAPDEVILLE, 1991,
Synchronized division of activated sludge microorganisms,
Wat. Res., 25, 817-822.
- FASS S., V. GANAYE, V. URBAIN, J. MANEM and J.C. BLOCK, 1994,
Volatile fatty acids as organic carbon sources in denitrification,
Environ. Technol., 15, 459-467.
- FETTER C.W., 1993,
Transformation, retardation and attenuation of solutes, Chapter three,
in *Contaminant Hydrogeology*, Maxwell Publishing Company, new York, 115-162.
- JORAND F., F. ZARTARIAN, J.C. BLOCK, F. THOMAS, J.Y. BOTTERO, G. VILLEMIN, V. URBAIN and J. MANHEM, 1995,
Chemical and structural (2D) linkage between bacteria with activated sludge flocs,
Wat. Res., 29, 1639-1647.
- KHATIB K., 1994,
Structure et réactivité des argiles organiques utilisées pour l'élimination des micropolluants en milieu aqueux,
Thèse de l'INPL, 29 septembre 1994, 206pages.
- List No.45, 1993,
Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB,
Inter. J. Systematic Bacteriol., 43, 398-399.
- MIGNOT L. and G.A. JUNTER, 1990,
Diffusion in immobilized-cell agar layers : influence of microbial burden and cell morphology on the diffusion coefficients of L-malic acid and glucose,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 418-423.
- OGAWA M., H. SHIRAI, K. KURODA and C. KATO, 1992,
Solid-state intercalation of naphthalene and anthracene into alkylammonium-montmorillonite,
Clays and clay minerals, 40, 485-490.
- RIJNAARTS H.H.M., A. BACHMANN, J.C. JUMELET and A.J.B. ZEHNDER 1990,
Effect of desorption and intraparticle mass transfert on the aerobic biomineralization of α -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil,
Environ. Sci. Technol., 24, 1349-1354.
- ROSENBERG M., D. GUTNICK and E. ROSENBERG, 1980,
Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring hydrophobicity,
FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33.
- SCHWARZENBACH R.P., P.H. GSCHWEND and D.M. IMBODEN, 1993,
Environmental organic chemistry,
John Wiley & Sons inc., New York, 681pages.

- SIMKINS S. AND M. ALEXANDER, 1984,
Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density,
Appl. Environ. Microbiol., 47, 1299-1306.
- WODZINSKI R.S. and D. BERTOLINI, 1972,
Physical state in which naphthalene and biphenyl are utilized by bacteria,
Appl. Microbiol., 23, 1077-1081.
- WU S.C. and P.M. GSCHWEND, 1986,
Sorption kinetics of hydrophobic organic compound to natural sediments and soils,
Environ. Sci. Technol., 20, 717-725.
- YABUUCHI E., Y. KOSAKO, H. OYAIZU, I. YANO, H. HOTTA, Y. HASHIMOTO, T. EZAKI and M. ARAKAWA, 1992,
Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology Group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb.nov.,
Microbiol. Immunol., 36, 1251-1275.

CHAPITRE 4

INTERACTIONS DU NAPHTALENE AVEC DES PARTICULES ARGILEUSES EN MILIEU AQUEUX

Chapitre 4. Interactions du naphthalène avec des particules argileuses en milieu aqueux	73
4.1. Introduction	73
4.2. Protocole expérimental.....	75
4.2.1. Perte du naphthalène par adsorption sur les parois et par volatilisation	75
4.2.2. Cinétiques d'adsorption du naphthalène	76
4.2.3. Cinétiques de désorption	77
4.2.4. Isothermes d'adsorption.....	77
4.2.5. Isothermes de désorption.....	78
4.2.6. Gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène	78
4.3. Résultats.....	79
4.3.1. Perte de naphthalène par volatilisation et adsorption sur les parois.....	79
4.3.2. Cinétiques d'adsorption et de désorption du naphthalène.....	80
4.3.3. Isothermes d'adsorption et de désorption	86
4.3.4. Gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène	91
4.4. Discussion.....	92
4.5. Conclusions.....	94

Chapitre 4. Interactions du naphthalène avec des particules argileuses en milieu aqueux

4.1. Introduction

Le devenir d'un polluant organique dans des systèmes aqueux, qu'il soit volatile, photodégradable, hydrolysable, biodégradable, est non seulement lié aux caractéristiques physico-chimiques de la molécule (Fetter, 1993, Schwartzbach *et al.*, 1993; Karickhoff, 1980) mais aussi aux caractéristiques de la phase eau (force ionique, pH, matière organique dissoute) (Kukkonen and Oikari, 1991; Zhou *et al.*, 1994) et à la quantité et à la nature des particules présentes en suspension (Hegeman *et al.*, 1995; Scow et Alexander, 1992; Scow et Hutson, 1992). En effet, la présence de particules engendre une rétention des polluants par adsorption sur la surface ou par diffusion dans les pores de la particule. Cette rétention contrôle le degré de biodisponibilité physico-chimique (Fu *et al.*, 1994) et biologique (Weber et Coble, 1968; Mihelcic et Luthy, 1991) du polluant.

Dans les sols et les sédiments, les argiles sont reconnues pour prendre une part importante dans la sorption des polluants ionisables et oligoéléments, car leur structure leur confère une grande surface spécifique et une capacité d'échange cationique qui permet une sorption par échange d'ions (Li et Gupta, 1994; Miller et Alexander, 1991; Weber et Coble, 1968). Les argiles, rarement libres, sont souvent associées à de la matière organique dans les sols et les milieux naturels. Les oxydes métalliques sont avec les argiles et la matière organique les constituant naturels qui retiennent les polluants. Ils ne seront cependant pas utilisés dans l'étude de rétention du naphthalène. La sorption de polluants sur des argiles organiques a déjà été étudiée (Bottero *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1990; 1994; Zhang et Sparks, 1993). C'est dans un but de relier la rétention d'un polluant à sa disponibilité vis-à-vis des microorganismes que cette étude sur les interactions naphthalène / argiles a été réalisée.

Quatre matériaux ont été utilisés dans cette étude : un matériau exclusivement minéral (montmorillonite sodique), deux supports organo-minéraux (complexe montmorillonite / polyacrylamide (§3.4.2), une argile organique codée B34 (§3.4.3) et un sédiment de rivière, plus représentatif d'un milieu naturel.

Une montmorillonite sodique, organisée en feuillets constituant eux-mêmes des empilements appelés tactoïdes a été choisie pour sa propriété à déployer une grande surface spécifique (maximum de $800 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ de solide) accessible aux polluants.

Une montmorillonite sodique dans l'espace interfoliaire (taille de l'espacement entre les feuillets) de laquelle ont été inclus des polyacrylamides de différente masse moléculaire (§3.4.2). Ces polyacrylamides modélisent la présence de matière organique dans les sédiments. Ces molécules présentent d'autant plus d'intérêt qu'elles ne sont pas biodégradables et ne peuvent pas

entrer en compétition avec le naphthalène dans les tests de biodégradation. La montmorillonite expansée par le polyacrylamide, sera appelée complexe.

Une argile organique, appelée B34, est une montmorillonite sur laquelle a été adsorbé par échange d'ions un tensioactif cationique, le diméthyl-distéaryl ammonium sous forme bromure : $[\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{17}]_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2\text{Br}$. C'est un matériau fortement hydrophobe choisi dans l'optique de retenir le naphthalène dans les chaînes du surfactant.

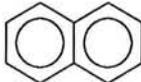
Un matériau naturel, un sédiment de rivière provenant de la Bièvre à Sarrebourg (Moselle, France) complète les supports.

Les caractéristiques physiques et chimiques des adsorbants sont données dans le tableau 3.1.

Le naphthalène, hydrocarbure polyaromatique, a été choisi comme modèle pour cette étude. C'est un produit qui existe à l'état naturel, dans le charbon et le pétrole, (Guerin et Boyd, 1992; Luthy *et al.*, 1994) mais c'est aussi un produit d'origine anthropogénique provenant de l'industrie chimique et en particulier de la fabrication de solvants (AlBashir *et al.*, 1990). Il se retrouve souvent dispersé dans les sols et les sédiments où il est soumis à des transformations abiotiques et biologiques (Zhang *et al.*, 1995).

Faiblement soluble dans l'eau (30mgL^{-1} à 25°C), solide à température ambiante et de faible masse moléculaire, le naphthalène est classé parmi les "légers" et se volatilise à température ambiante (Tableau 4.1).

Tableau 4.1. Propriétés physiques du naphthalène

Propriétés	Valeurs	Références
Formule chimique	$\text{C}_{10}\text{H}_{18}$ 	
Masse moléculaire	128,17	
Solubilité à 30°C	33mgL^{-1}	Breure <i>et al.</i> (1991)
$\log K_{ow}$	3,36	Karickhoff (1981)
	3,3	Mihelcic et Luthy (1991)
$\log K_{oc}$	$2,56 < < 2,78$	Guerin et Boyd (1992)
Tension de vapeur	$7,2\text{ Pa}$ à 20°C 34 Pa à 30°C	Fiche toxicologique n°204 INRS Handbook (1990)
Constante de Henry	$4,9 \cdot 10^{-4}\text{ bar m}^3\text{mol}^{-1}$	Handbook of Chemistry and Physics (1990)
Toxicité	non cancérigène ni mutagène	Cerniglia (1993)

Ainsi, lorsqu'un équilibre s'établit entre une phase eau et une phase gaz, la concentration dans la phase aqueuse est estimée par une loi de Henry (Sigg *et al.*, 1994) :

$$C_{aq} = H \times p_i$$

où C_{aq} est la concentration dans l'eau, H la constante de Henry et p_i la pression partielle du composé gazeux.

5% de perte en 5h, dus à une volatilisation du naphthalène, dans des conditions expérimentales hermétiques (flacons fermés par un septum Téflon) sont considérés comme négligeables par Guerin et Boyd (1992). D'autres auteurs ont limité la perte par réinjection de l'air en contact avec la surface dans les réacteurs (Bruiton et Capdeville, 1993). Le naphthalène est capable de s'accumuler dans des phases organiques de type octanol ($\log K_{ow} \approx 3,3$; Karickhoff, 1981) ou dans de la matière organique des sols ($\log K_{oc} \approx 2,6$; Guerin et Boyd, 1992). Comparativement à d'autres hydrocarbures polycycliques tel que le pyrène qui possède un coefficient de partage entre l'octanol et l'eau dont le logarithme vaut 5,2, le naphthalène est considéré comme une molécule moyennement hydrophobe.

Ce chapitre a pour objectif l'étude des interactions d'un polluant organique (naphthalène) avec des suspensions minérales et organo-minérales. Nous nous intéresserons tout d'abord à la quantification de sa perte par volatilisation, puis dans un deuxième temps, à l'aspect cinétique de sa rétention par les particules solides et enfin à sa distribution entre la phase liquide et le solide à l'état d'équilibre.

4.2. Protocole expérimental

4.2.1. Perte du naphthalène par adsorption sur les parois et par volatilisation

Trois flacons Téflon de 250 mL (Nalgène) et 3 flacons plasma de 500 mL lavés contenant chacun un barreau magnétique recouverts de téflon sont stérilisés par autoclavage. Les flacons Téflon sont bouchés à l'aide des bouchons à vis en matière Téflon et les flacons plasma à l'aide d'un septum en caoutchouc et d'un bouchon métallique percé à vis. Les flacons Téflon sont remplis avec 100 mL de solution stérile de naphthalène (§3.3) et les flacons plasma avec 200 mL, le volume de liquide dans chaque flacon correspondant ainsi à 2/5 du volume total disponible.

Les flacons sont placés sur un agitateur multipostes Variomag (Bioblock) à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Les flacons sont laissés ainsi sans être ouverts pendant 4 jours de façon à évaluer la perte (volatilisation et adsorption) du composé et à choisir ensuite le type de flaconnage.

Le naphthalène est dosé en HPLC (§3.6) aux temps $t = 0$ et $t = 4$ jours.

4.2.2. Cinétiques d'adsorption du naphthalène

Les mesures de cinétique d'adsorption du naphthalène sur (i) la montmorillonite sodique seule, (ii) le complexe montmorillonite sodique / polyacrylamide, (iii) l'argile organique B34, (iv) le sédiment et (v) la biomasse bactérienne sont réalisés en réacteurs batchs selon le protocole général suivant :

8 flacons en Téflon de 250mL (nalgène) stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes numérotés de 1 à 8 reçoivent le matériau support et 8 autres flacons servent de témoins de volatilisation. 100mL de milieu de naphthalène stérile (§3.3) sont alors versés stérilement dans chaque flacon. Les flacons sont placés sur un agitateur multipostes Variomag 20W (Bioblock) et les suspensions sont agitées à l'aide de barreaux magnétiques en Téflon (500 tours par minute) à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

A différents temps t , 10mL de la suspension et 10 mL de solution témoin sont centrifugés à 45000g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant est récupéré dans des tubes ambrés et le naphthalène en solution est dosé en HPLC (§3.6).

La quantité de naphthalène adsorbée q est calculée par différence entre la concentration de naphthalène en solution dans le témoin (au temps t) et la concentration au même temps t dans l'essai contenant l'adsorbant.

Les quantités de support ajoutés dans les flacons essai sont les suivantes : 50mg de montmorillonite broyée, séchée et stérilisée par autoclavage (§3.4.1), 25mg de complexe montmorillonite/polyacrylamide (§3.4.2) lyophilisé et conservé dans un dessiccateur, 50mg d'argile organique B34 lavée au méthanol (§3.4.3), 100mg de sédiment.

Les flacons contenant la montmorillonite sodique sont préalablement agités pendant 15 minutes puis subissent une sonication de 3 minutes à une puissance de 85W dans un bain (Bioblock) de façon à disperser rapidement l'argile (les flacons ne sont ainsi pas ouverts et ne risquent pas d'être contaminés).

Les essais sont réalisés d'une part avec le sédiment non stérilisé et d'autre part avec le sédiment contenant 40mgL^{-1} de HgCl_2 de façon à prévenir une éventuelle dégradation microbienne. Des contrôles de non croissance de la flore autochtone sont réalisés par étalement de 0,1mL de la suspension sédiment sur milieu gélosé (§3.1.3).

Les mesures de cinétique d'adsorption du naphthalène sur les bactéries mortes sont réalisées avec 3.10^9 bactéries mL^{-1} (comptage en épifluorescence) (§3.1.4) (*Burkholderia cepacia*). La moitié des flacons reçoivent 2mL de la suspension de bactéries tuées par autoclavage (20 minutes à 121°C) et l'autre moitié reçoit 2mL de bactéries tuées par ajout de chlorure mercurique à la suspension avec une concentration finale de 40mgL^{-1} .

Toutes les cinétiques sont réalisées en triplicat.

4.2.3. Cinétiques de désorption

Les mesures de cinétique de désorption du naphthalène sont réalisées à partir (i) du complexe montmorillonite sodique / polyacrylamide, (ii) de l'argile organique B34 et (iii) du sédiment naturel. Les témoins de volatilisation n'ont pu être réalisés.

Dans un premier temps, 50 mg de particules adsorbantes (complexe ou B34) ou 100mg de sédiment sont ajoutés à 8 flacons stériles en Téflon de 250mL (nalgène) numérotés de 1 à 8. Les flacons contenant le support et les 8 flacons sans particule (témoins) sont remplis avec 100mL de solution stérile à base de naphthalène (§3.3). Les flacons sont placés sur un agitateur multipostes Variomag 20W (Bioblock) et les suspensions sont agitées à l'aide de barreaux magnétiques en Téflon (500 tours par minute) à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Dans une seconde phase à $t = 12$ heures, la suspension est transférée stérilement, dans des tubes à centrifuger stériles en Téflon de 50mL (Nalgène) et centrifugée à 45000g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot de chaque flacon est repris par 100mL de milieu minéral stérile exempt de naphthalène (§3.2).

Les flacons sont alors le plus rapidement possible replacés sur l'agitateur multipostes Variomag (Bioblock) et l'agitation est lancée au temps $t = 0$. A différents temps, la suspension est centrifugée à 45000g pendant 10 minutes. Après centrifugation, le surnageant est récupéré dans des tubes pour passeur HPLC et le naphthalène en solution est dosé en HPLC (§3.6).

4.2.4. Isothermes d'adsorption

Les expériences sont conduites en batch avec des quantités différentes (i) de complexe montmorillonite / polyacrylamide (ii) d'argile organique B34 et (iii) de sédiment naturel.

Des échantillons de 0, 0,001, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,075 et 0,1g de particules argileuses (complexe et B34) sont placées dans des flacons en Téflon à col large de 250mL (nalgène); Le même nombre de flacons sans particule adsorbante sert de témoins. 100mL de solution tamponnée stérile à base de naphthalène (§3.3) sont alors ajoutés à chaque flacon. Des concentrations de 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40 et 50 gL^{-1} de sédiment non stérilisé sont employées.

Les flacons sont alors placés sur un agitateur multipostes Variomag 20W (Bioblock) et les suspensions sont agitées (500 tours par minute) à l'aide de barreaux magnétiques de 35 mm recouverts de Téflon (Osi) à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Après 12 heures d'agitation temps au bout duquel l'équilibre est atteint (§4.3.2), la suspension est centrifugée à 45000g pendant 10 minutes dans des tubes Téflon. Le surnageant est récupéré et le naphthalène en solution est dosé par HPLC (§3.6).

La quantité de naphthalène adsorbée sur la montmorillonite q_e est calculée par différence. L'expérience est répétée au minimum 3 fois.

4.2.5. Isothermes de désorption

Après 12 heures d'agitation (équilibre atteint), chaque suspension provenant des essais des isothermes d'adsorption est centrifugée à 45000g pendant 10 minutes dans des tubes Téflon de 50mL. Le culot est replacé dans milieu minéral exempt de naphthalène (§3.2), agité pendant 12 heures et le naphthalène relargué dans le milieu est dosé par HPLC (§3.6) après centrifugation à 45000g pendant 10 minutes. Aucun témoin de volatilisation n'a été réalisé.

4.2.6. Gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène

La diffraction X a été utilisée afin de déterminer les modifications entraînées par l'adsorption du naphthalène sur un empilement de feuillets d'argile. Ceci s'avère intéressant dans le cas de l'argile organique B34 qui retient de fortes quantités de naphthalène.

Lorsqu'un échantillon présentant une structure ordonnée (cristal ou plans équidistants) est soumis à un rayonnement, les interférences entre les ondes secondaires produisent des pics d'intensité à des angles caractéristiques de l'équidistance. La relation angle-équidistance est donnée par l'équation de Bragg : $n \lambda = 2 d \sin \theta$, avec λ longueur d'onde, n nombre de diffraction, θ angle et d distance entre les plans.

Quelques grammes d'argile organique B34 sont mouillés avec quelques gouttes du milieu minéral (§3.2) et sont mélangés pendant quelques minutes de façon à obtenir une pâte. La pâte est étalée uniformément sur une lame de verre de microscopie. Trois lames de verre sont exposées à une atmosphère saturée en naphthalène pendant 7 jours, trois lames dans une atmosphère dépourvue de naphthalène servent de témoins. Les expositions sont réalisées à 30°C dans des flacons hermétiquement fermés.

Les mesures ont été réalisées au Centre de Recherches Pétrographiques et Géochimiques (CNRS) de Vandoeuvre sur un appareil Jobin-Yvon opérant par réflexion sur la raie $K_{\alpha 1}$ du cuivre ($\lambda = 154\text{\AA}$).

4.3. Résultats

4.3.1. Perte de naphthalène par volatilisation et adsorption sur les parois

La perte du naphthalène par volatilisation et par adsorption sur les parois a conduit à un choix de flaconnage en Téflon. En effet, l'utilisation de flacons Téflon munis de bouchons à vis en Téflon minimise les pertes comparativement aux flacons "Plasma" en verre avec un septum caoutchouc. La perte reste cependant relativement élevée puisque sans ouverture en 4 jours, 33% de naphthalène (Téflon) et 94% (Plasma) disparaissent respectivement de la phase eau (Annexe 7).

L'analyse des données des flacons témoins en Téflon des 63 essais réalisés dans notre étude a permis de calculer une perte moyenne de 20,1 (6,3)% du naphthalène due à la volatilisation pour un temps moyen de 16 heures. Cette perte correspond à 6, 7 ou 8 ouvertures des flacons sur des temps de mesure compris entre 10h et 25h pour des concentrations initiales en naphthalène comprises entre 9 et 32 mgL⁻¹.

Il est possible d'ajuster une modélisation du premier ordre à la perte de naphthalène par ouverture successive des flacons, expliquant ainsi un équilibre jamais atteint. Sur ces essais, une constante cinétique moyenne du premier ordre de volatilisation a été estimée à $k = 0,012\text{h}^{-1}$. La figure 4.1 montre l'ajustement du premier ordre. Bien que statistiquement significatif au seuil de 0,01, l'ajustement témoigne d'une grande dispersion des points expérimentaux.

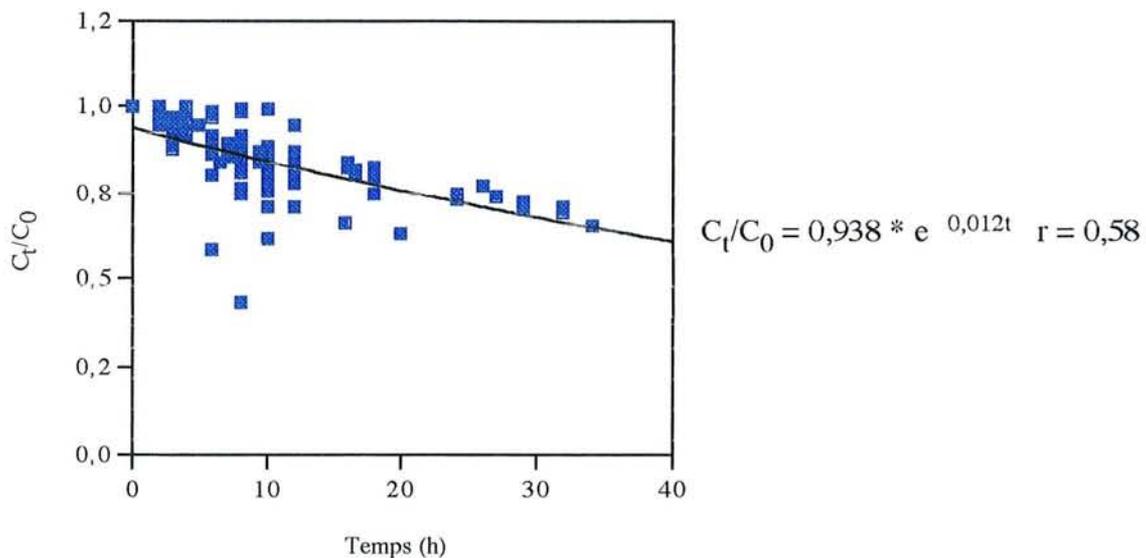


Figure 4.1. Evolution du rapport de la concentration en naphthalène au temps $t=0$ et de la concentration au temps t dans un milieu stérile contenu dans un flacon en Téflon 63 essais - Température de 30°C et agitation à 500rpm par barreaux magnétiques

La perte du naphthalène par volatilisation, même avec l'emploi de flacons Téflon n'est pas négligeable. Elle a nécessité pour chaque essai abiotique (sorption) ou biotique (biodégradation), la mise en place de témoins de volatilisation de façon à pouvoir compenser les valeurs mesurées pour chaque essai. Pour les essais abiotiques, il suffit d'ajouter la perte mesurée dans les flacons témoins aux valeurs des essais. Par contre, pour les essais biotiques, la volatilisation modélisée selon un premier ordre est retranchée d'une fonction théorique s'ajustant à la courbe de biodégradation (§3.11.5)

Parce que le naphthalène est un composé volatile et adsorbable sur différents matériaux, il est difficile, au cours des essais de différencier l'adsorption sur les parois de la volatilisation car la mesure de la perte du naphthalène est une mesure globale. Toutefois, sans pouvoir distinguer les deux phénomènes, il sera considéré que la perte par adsorption sur les récipients est négligeable par rapport à la perte par volatilisation.

4.3.2. Cinétiques d'adsorption et de désorption du naphthalène

L'expression cinétique de l'adsorption et de la désorption du naphthalène est à la fois un terme caractéristique de "l'affinité" du composé pour l'adsorbant testé et une grandeur nécessaire pour cadrer et comparer les essais.

Les cinétiques d'adsorption (en rouge) et de désorption (en bleu) du naphthalène avec cinq différents supports, montmorillonite de sodium, complexe montmorillonite / polyacrylamide de 2 masses moléculaires (44000 et $2,5 \cdot 10^6$), argile organique B34, sédiment et *Burkholderia cepacia* sont présentés sur les figures 4.2. Ces courbes montrent le comportement du naphthalène dans des suspensions en fonction du temps. Les essais ont été réalisés avec des concentrations en particules de $0,5 \text{ gL}^{-1}$, une concentration de 1 gL^{-1} pour le sédiment et une concentration totale de bactéries de $3 \cdot 10^9$ bactéries mL^{-1} . Les résultats bruts sont données en annexe 8. Les témoins de volatilisation ont été pris en compte pour l'adsorption, mais pas pour la désorption car aucun témoin n'a été réalisé.

La figure 4.2 fournit deux types d'informations. Elle renseigne sur la vitesse initiale et donc le temps nécessaire pour atteindre l'état quasi-stationnaire (appelé équilibre) et d'autre part sur la quantité adsorbée ou désorbée à l'équilibre, pour une comparaison des adsorbants.

Les cinétiques d'adsorption et de désorption sont rapides, puisque quel que soit le système, l'équilibre est atteint en 2 heures environ pour une température de 30°C . Elles présentent des allures différentes en fonction de la nature des particules en suspension : les quantités adsorbées sont différentes. Un test de désorption confirme que la montmorillonite (Figure a) n'adsorbe pas le naphthalène. Cette conclusion se justifie par le fait que sur trois essais réalisés avec des concentrations initiales différentes en naphthalène, deux essais ne montrent aucune rétention du naphthalène par l'argile et seul un essai indique une très faible rétention ($< 1 \text{ mg g}^{-1}$) proche de l'erreur de mesure. Il sera retenu que la montmorillonite n'adsorbe pas le naphthalène.

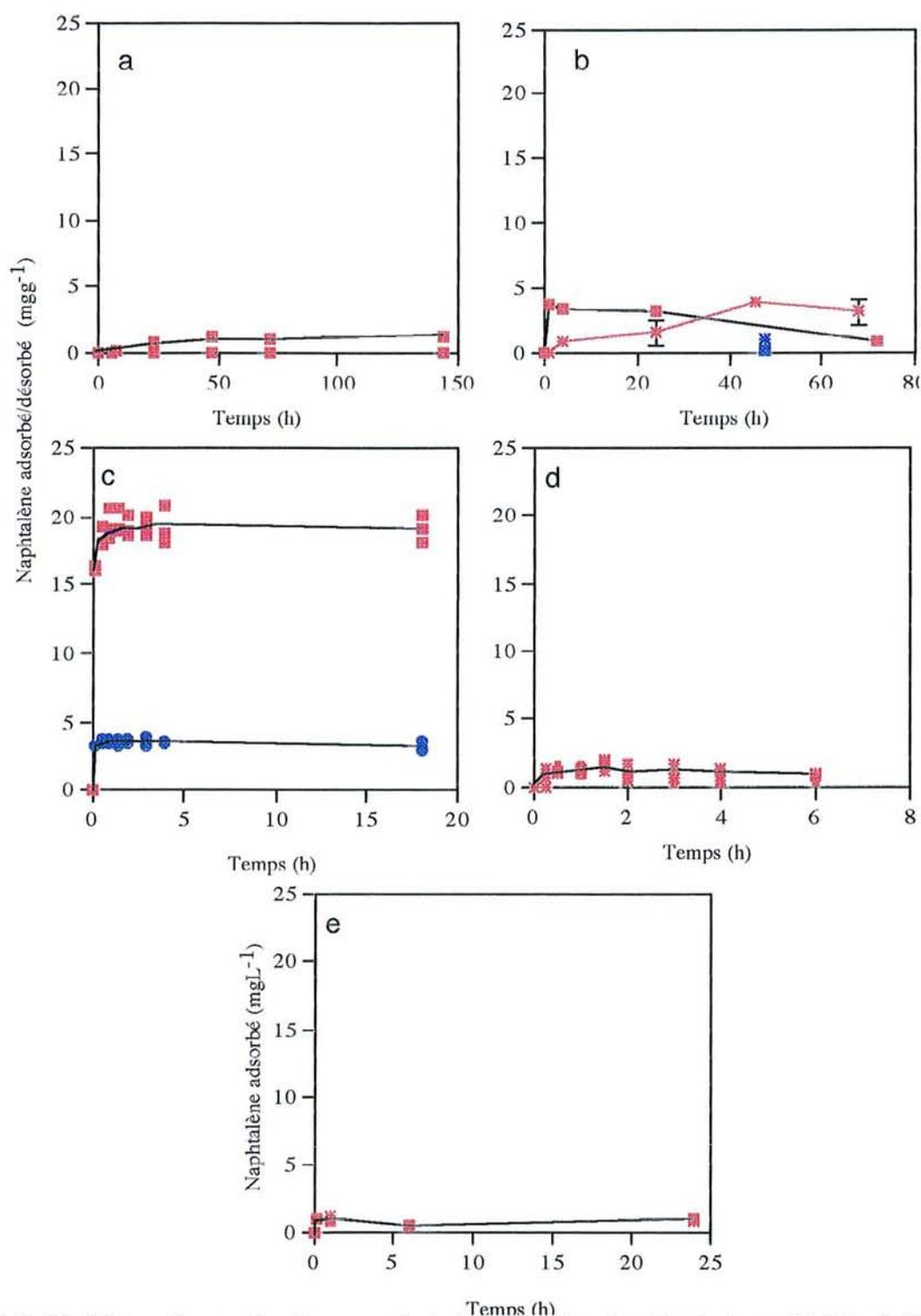


Figure 4.2. Cinétiques de sorption (en rouge) et de désorption (en bleu) du naphthalène à 30°C. a) Adsorption avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite de sodium (triplicat sur trois concentrations initiales : 16,7; 11,6; et $5,9\text{mgL}^{-1}$); b) Adsorption (.....*.....) et désorption (■) avec $0,25\text{gL}^{-1}$ de complexe 44000 (duplicats sur $C_i = 27,5\text{mgL}^{-1}$), Adsorption (—■—) et désorption (—*—) avec $0,25\text{gL}^{-1}$ de complexe $2,6 \cdot 10^6$ (duplicat sur $C_i = 24,5\text{mgL}^{-1}$); c) Adsorption (—■—) et désorption (●) avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de B34 (Tripliquat $C_i = 13,4\text{mgL}^{-1}$); d) Adsorption (—■—) avec 1gL^{-1} de sédiment et (.....*.....) sédiment additionné de 40mgL^{-1} HgCl_2 (Duplicat $C_i = 28,9\text{mg/L}$); e) Adsorption sur la biomasse bactérienne *Burkholderia cepacia* ($3 \cdot 10^9 \text{bactmL}^{-1}$) (4 essais $C_i = 15\text{mgL}^{-1}$ de naphthalène) stérilisation par autoclavage (—■—) et par ajout de 40mgL^{-1} de HgCl_2 (—*—)

Les complexes, quel que soit la masse moléculaire du polyacrylamide (Figure b) ainsi que le sédiment (Figure d) ont des capacités de sorption similaires vis-à-vis du naphthalène. Le sédiment et le complexe présentent une rétention très faible de l'hydrocarbure ($1,8\text{mgg}^{-1}$ de complexe et $1,1\text{mgg}^{-1}$ de sédiment).

L'argile organique B34, quant à elle, adsorbe beaucoup plus de naphthalène (en moyenne $20,6\text{ mg/g}$ pour une concentration de $0,5\text{gL}^{-1}$ de particules et une C_i de $13,4\text{mgL}^{-1}$ de naphthalène). Elle adsorbe 10 à 20 fois plus que les complexes ou que le sédiment.

Malgré une sorption apparente du naphthalène sur la biomasse bactérienne (Figure e) ($1\text{mg } 3.10^{-12}$ bactéries, soit environ $0,13\text{mg g}^{-1}$ de biomasse), la "biosorption" du naphthalène sur les bactéries sera considéré comme négligeable dans la suite des essais. En effet l'utilisation de 10^7 bactéries mL^{-1} , concentration généralement employée dans les essais de biodégradation et correspondant à une biosorption de environ $0,01\text{mg}$ de naphthalène pour une concentration de 10^7 bactéries mL^{-1} , ne contribue pas à diminuer la concentration en naphthalène dans la phase aqueuse de façon significative. Il est intéressant de noter que les deux modes de stérilisation, par autoclavage ou par ajout de chlorure mercurique à 40mgL^{-1} conduisent aux mêmes résultats.

Le tableau 4.2 résume les quantités de naphthalène adsorbées par les différents supports testés dans cette étude. L'argile organique B34 apparaît comme le meilleur adsorbant.

Tableau 4.2. Quantités de naphthalène retenu à l'équilibre par les adsorbants (mg g^{-1}) en fonction des concentrations initiales en naphthalène (C_i)

Adsorbant	Naphtalène initial (mgL^{-1})	Naphtalène adsorbé (mg g^{-1})
Montmorillonite de sodium	16,7; 11,6; 5,9	0
Complexe	24,5	1,8
Argile organique B34	13,4	20,6
Sédiment	28,9	1,1
<i>Burkholderia cepacia</i>	15	0,13

Un ajustement à un modèle du premier ordre (§3.11.1) a été appliqué à la cinétique d'adsorption du naphthalène sur l'argile organique B34, adsorbant présentant les capacités adsorbantes les plus élevées (Figure 4.3).

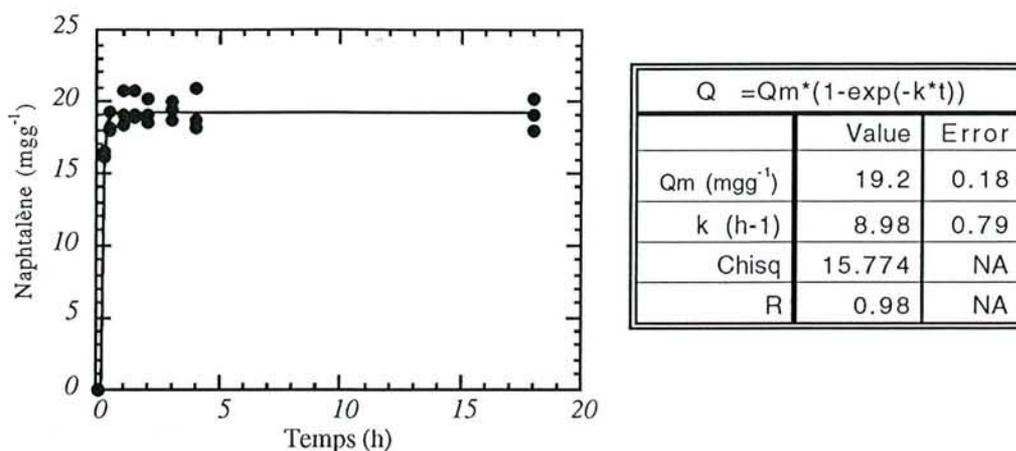


Figure 4.3. Cinétique de sorption du naphthalène sur 0,5gL⁻¹ d'argile organique B34 . Modélisation du premier ordre - Ci=13,4mgL⁻¹ - Agitation à 500rpm à 30°C

La valeur maximale adsorbée calculée est de 19,2 mg de naphthalène par gramme de B34. Cette valeur est en accord avec la valeur expérimentale de 20,6mg g⁻¹. La constante cinétique du premier ordre k est élevée (environ 9h⁻¹) expliquant la rapide mise à l'équilibre.

Après l'analyse de l'adsorption du naphthalène, la désorption a été étudiée avec les supports adsorbants, c'est-à-dire le complexe, l'argile organique B34 et le sédiment. Les courbes de la figure 4.2 montrent que le naphthalène retenu par ces trois adsorbants repasse en solution lorsque les particules après séparation de la phase liquide par centrifugation sont remises en suspension dans le milieu minéral exempt de naphthalène.

Des essais complémentaires de désorption du naphthalène à partir de l'argile organique B34 (capacité de rétention la plus forte comparée aux 4 adsorbants testés) ont été réalisées sur des quantités adsorbées différentes (*ie* différentes quantités en adsorbant) (Figure 4.4). Chaque point correspond à une valeur brute, *ie* la volatilisation n'est pas prise en compte.

Il est à retenir des courbes de la figure 4.4 que l'équilibre de désorption est atteint rapidement (environ 2 heures). La diminution de la concentration visualisée à partir de t=3h est due au phénomène de volatilisation du substrat. En effet, la désorption est mesurée directement par la quantité de naphthalène relargué dans la phase aqueuse et la volatilisation n'est pas déduite des valeurs tracées.

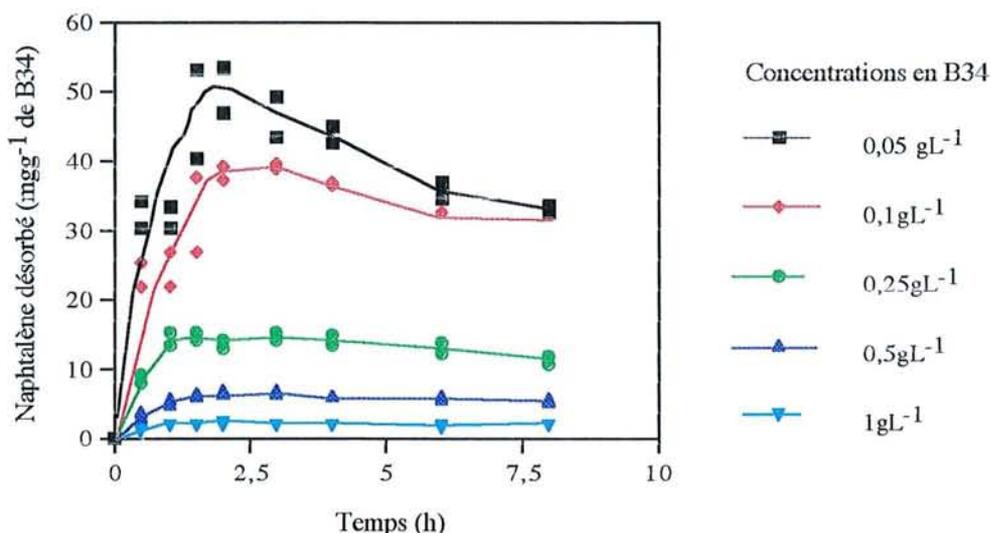


Figure 4.4. Cinétiques de désorption du naphthalène. Concentrations initiales en B34 comprises entre 0,05 et 1gL⁻¹ - Agitation à 500rpm à 30°C (Valeurs brutes en annexe 9)

Le tableau 4.3 réunit les quantités massiques (mg) et les pourcentages de l'hydrocarbure initialement adsorbé et désorbé.

Tableau 4.3. Quantités et pourcentages de naphthalène adsorbé à t = 16h et à t = 2h après désorption

B34 (gL ⁻¹)	Naphtalène ¹ adsorbé (mg)	% adsorbé ²	Naphtalène ¹ désorbé (mg)	% restant adsorbé ³
0,05	0,27 (0,02)	17	0,23 (0,02)	15
0,1	0,64 (0,02)	40	0,38 (0,02)	40
0,25	0,89 (0,01)	57	0,37 (0,02)	58
0,5	1,14 (0,02)	73	0,34 (0,02)	70
1	1,29 (0,02)	83	0,25 (0,01)	81

1 La quantité de naphthalène adsorbé et désorbé est exprimée en masse pour l'essai (Volume de la suspension = 100mL - 1,57 mg de naphthalène) (corrigé de la volatilisation pour le naphthalène adsorbé et non corrigé de la volatilisation pour le désorbé)

2 Le pourcentage adsorbé est calculé par rapport à la quantité initiale en naphthalène : 1,57 mg dans 100mL de milieu

3 Le pourcentage restant adsorbé après désorption est calculé par rapport à la quantité initiale en naphthalène sorbé (colonne 2)

Les nombres en parenthèses sont les écart-types (n = 2)

Le tableau 4.3 montre que les pourcentages adsorbés après 16 heures et les pourcentages de naphthalène restant adsorbé sont identiques. Par exemple, pour une concentration en argile organique B34 de 0,5gL⁻¹, après un équilibre d'adsorption, 73% du naphthalène est sous forme adsorbée et 70% de la fraction adsorbée reste sur l'adsorbant après désorption. Ces valeurs signifient qu'un même équilibre d'adsorption et de désorption s'établit entre les particules solides (B34) et le milieu aqueux.

Tout comme pour les cinétiques d'adsorption, la cinétique de désorption peut être ajustée à un modèle du premier ordre (§3.11.1). Ainsi, la figure 4.5 montre l'ajustement de la cinétique de désorption du naphthalène à partir de $0,5\text{gL}^{-1}$ d'argile organique B34. Cette cinétique de désorption correspond à l'adsorption de la figure 4.3. La concentration initiale en naphthalène avant adsorption est de $13,4\text{mgL}^{-1}$ et la quantité adsorbée est de $20,6\text{mg g}^{-1}$.

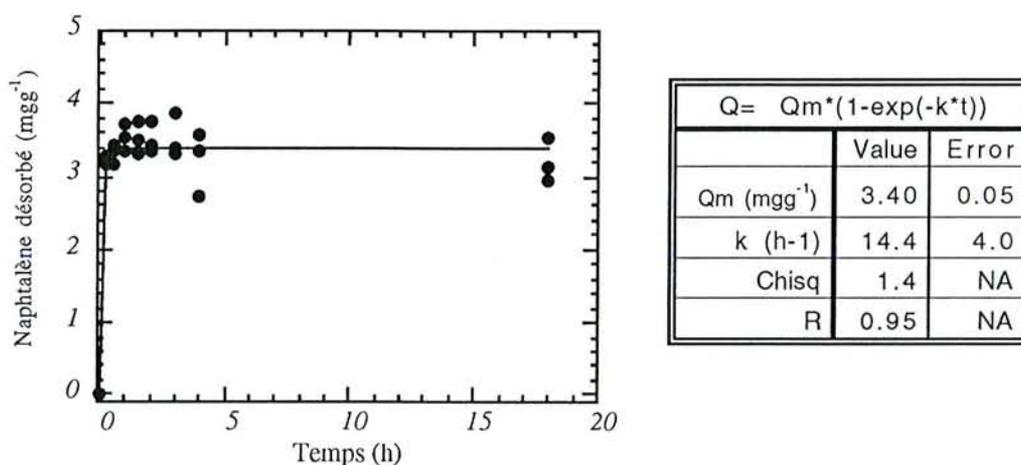


Figure 4.5. Cinétique de désorption du naphthalène à partir de l'argile organique B34 - Ajustement à un modèle du premier ordre ($20,6\text{mg g}^{-1}$ de naphthalène adsorbé - $0,5\text{gL}^{-1}$ de B34 - 30°C)

L'ajustement selon un premier ordre convient bien aux points expérimentaux. La valeur du coefficient de corrélation vaut 0,95 et la valeur calculée de la quantité maximale pouvant être désorbée est identique à la valeur expérimentale ($3,4\text{mg}$ de naphthalène g^{-1} de B34). La désorption, tout comme l'adsorption est un phénomène rapide puisque la constante k vaut $14,4\text{h}^{-1}$. L'équilibre est atteint en moins de 2 heures.

Un même ajustement a été réalisé sur les courbes de désorption du naphthalène pour différentes concentrations d'argile organique B34 (Figure 4.4). Les constantes k et les vitesses de désorption initiales calculées sur les 2 premières heures de la cinétique sont reportées dans le tableau 4.4.

Le tableau 4.4 informe que les valeurs des vitesses initiales de désorption sont identiques pour chaque concentration en argile organique de même que les constantes cinétiques du premier ordre. Une moyenne de $0,14\text{mg/h}$ ($0,028$) a pu être calculée pour la vitesse initiale et $1,84\text{h}^{-1}$ ($0,56$) pour la constante k . La vitesse de désorption est indépendante de la quantité initiale adsorbée et ce dans la gamme des concentrations utilisées dans cette étude.

Cette dernière constatation suggère que la répartition du naphthalène entre la phase liquide et la phase solide est la même quelle que soit la quantité de B34 dans chaque réacteur.

Tableau 4.4. Vitesses initiales de désorption et constantes cinétiques du premier ordre de désorption (k) du naphthalène à partir de B34 pour des quantités initialement adsorbés différentes

B34 (gL ⁻¹)	Naphtalène adsorbé (mg)	Vitesses désorption (mg h ⁻¹)	k (h ⁻¹)
0,05	0,23 (0,01)	0,12 (0,015)	1,90 (0,43)
0,1	0,38 (0,02)	0,17 (0,026)	1,44 (0,27)
0,25	0,37 (0,01)	0,17 (0,002)	2,21 (0,33)
0,5	0,34 (0,01)	0,17 (0,015)	1,71 (0,17)
1	0,25 (0,01)	0,12 (0,002)	1,95 (0,28)

La quantité maximale de naphthalène désorbé (calculé par la modélisation du premier ordre) est exprimée en mg de naphthalène pour chaque essai (Volume = 100mL - 1,57mg de naphthalène)

Les nombres en parenthèses sont les écart-types (n = 2)

Cette étude des cinétiques d'adsorption et de désorption du naphthalène a permis d'identifier un support non adsorbant, la montmorillonite de sodium, trois supports faiblement adsorbants que sont le complexe montmorillonite/polyacrylamide, le sédiment et la biomasse bactérienne, et un support possédant une forte affinité pour le naphthalène, l'argile organique B34. De surcroît, la mesure des cinétiques montre que les processus d'adsorption et de désorption sont rapides puisque en 2 heures environ, l'équilibre est atteint.

4.3.3. Isothermes d'adsorption et de désorption

D'après l'étymologie, une isotherme est une courbe tracée pour une même température. Une isotherme de sorption est une courbe qui traduit un équilibre de sorption d'un composé entre une phase solide et une phase liquide. Elle permet d'apprécier, à une température donnée, une capacité d'accumulation d'un adsorbant par un adsorbant par l'intermédiaire d'un coefficient de distribution K (Freundlich) ou dans certains cas, d'estimer une valeur maximale Q_m de cette capacité (Langmuir).

Les deux types de modélisation (Langmuir et Freundlich (§3.11.2)) sont ici employées.

L'équation de Freundlich s'écrit $Q_e = K.C_e^n$ et celle de Langmuir s'écrit : $Q_e = Q_m.b.C_e / 1+b.C_e$

avec : Q_e : Quantité de composé adsorbé à l'équilibre (mg g⁻¹)

Q_m : Quantité maximale pouvant s'adsorber sur le solide (mg g⁻¹)

C_e : Concentration du composé dans la phase liquide à l'équilibre (mgL⁻¹)

b : Rapport entre la constante cinétique d'adsorption et de désorption (k₁/k₂)

K : Constante de distribution entre la phase liquide et la phase solide (Lg⁻¹)

n : Paramètre de non linéarité de la courbe (sans unité)

Les résultats sont tracés en double inverse permettant ainsi une linéarisation des données. 1/Q_e est tracé en fonction de 1/C_e et l'inverse de l'ordonnée à l'origine donne une évaluation la capacité

maximale d'adsorption et la pente est égale à l'inverse du produit de Q_m et de b .

Les modélisations selon Freundlich et Langmuir ont été appliquées pour les isothermes d'adsorption et de désorption avec le complexe montmorillonite/polyacrylamide, la B34 et le sédiment.

Sur la seule base des coefficients de corrélation des ajustements aux isothermes d'adsorption du naphthalène sur l'argile organique B34 ($r=0,87$ pour Freundlich et $r=0,89$ pour Langmuir) et sur le sédiment (0,99 pour Freundlich et 0,92 pour Langmuir), il est impossible de déterminer quel modèle d'isothermes s'ajuste le mieux aux valeurs expérimentales. En effet, la faible gamme de concentration testée (due à une limitation par la solubilité du naphthalène 30mgL^{-1}) ainsi qu'une forte dispersion des points pour les concentrations les plus élevées expliquent l'impossibilité de déterminer si les adsorbants possèdent ou non une capacité maximale Q_m d'adsorption du naphthalène. Cette forte dispersion s'explique par des erreurs expérimentales dans une gamme de travail proche de la limite de précision des appareils. Pour exemple, les figures 4.6 et 4.7 décrivent respectivement une modélisation de l'adsorption du naphthalène sur l'argile organique B34 au modèle de Freundlich et au modèle de Langmuir (tracé en double inverse). Chaque point des isothermes d'adsorption prend en compte la perte par volatilisation car les valeurs sont retranchées des témoins. Les isothermes d'adsorption du naphthalène sur le complexe et le sédiment ainsi que les valeurs brutes sont données en annexe 10.

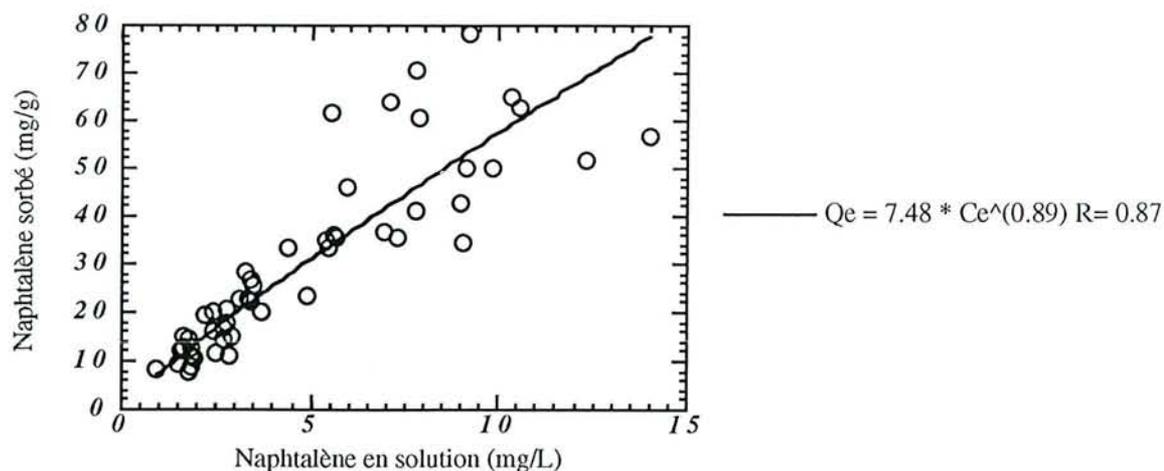


Figure 4.6. Isotherme de sorption du naphthalène sur l'argile organique B34 - Ajustement au modèle de Freundlich - Agitation à 500rpm à 30°C - Mesures à l'équilibre à $t=12\text{h}$ et $t=16\text{h}$

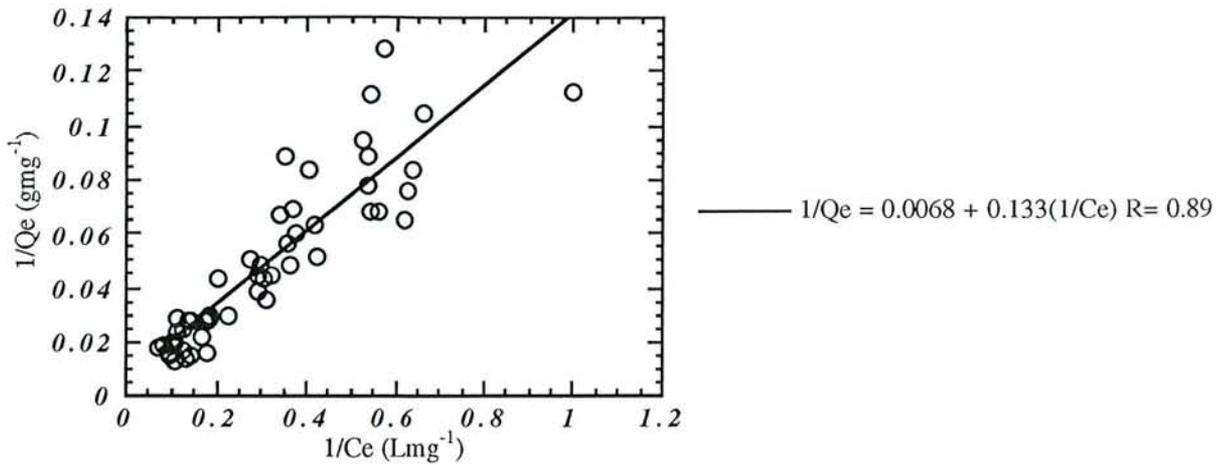


Figure 4.7. Isotherme de sorption du naphthalène sur l'argile organique B34 - Ajustement au modèle de Langmuir (tracé en double inverse) - Agitation à 500rpm à 30°C - Mesures à l'équilibre à $t=12h$ et $t=16h$

Le tableau 4.5 regroupe les valeurs des paramètres de Freundlich et de Langmuir estimés pour les isothermes d'adsorption du naphthalène sur la montmorillonite de sodium, le complexe montmorillonite/polyacrylamide, l'argile organique B34 et le sédiment.

Sachant que la montmorillonite de sodium n'adsorbe pas de naphthalène, les valeurs des paramètres des modèles sont nulles.

Tableau 4.5. Paramètres de Freundlich et de Langmuir pour la sorption du naphthalène

	Freundlich		Langmuir	
	k (Lg ⁻¹)	n	Qm (mgg ⁻¹)	b
Montmorillonite	0	-	0	-
Complexe	0,037	0,92	4,9	0,005
B34	7,48	0,89	147	0,051
Sédiment	0,032	0,76	7,3	0,002

Ces résultats confirment ce que suggéraient les résultats obtenus avec les cinétiques d'adsorption. Le complexe formé avec la montmorillonite et le polyacrylamide de poids moléculaire (44000) ainsi que le sédiment n'adsorbent que très peu le naphthalène : la constante de distribution entre la phase solide et la phase liquide n'est que de 0,037Lg⁻¹ et 0,032Lg⁻¹ respectivement. Par contre, l'argile organique B34 est capable de retenir environ 200 fois plus de naphthalène ($K=7,48Lg^{-1}$). Les valeurs des capacités maximales d'adsorption selon Langmuir (Q_m) corroborent ces résultats.

Les valeurs de n différentes de 1 indiquent le sens de la courbure de la courbe. Elles sont pour chaque adsorbant, inférieures à 1 et indiquent une convexité : le rapport quantité adsorbée sur concentration à l'équilibre diminue lorsque la concentration augmente. Elles sont toutefois proches de 1 et comme l'équation de Langmuir (l'adsorbant possède une capacité maximale d'adsorption) ne convient pas mieux que Freundlich, un cas particulier de la modélisation de Freundlich où $n=1$ a été appliqué aux isothermes d'adsorption. L'équation devient alors celle d'une droite et représente un partage entre la phase solide et la phase liquide; dans ce cas particulier, K s'écrit K_p .

Ces constantes de partage K_p peuvent être normalisées par rapport à la fraction de carbone organique (f_{oc}) contenu dans chaque support (Tableau 4.6).

Tableau 4.6. Constantes de partage K_p de K_{oc}

	K_p (Lg^{-1})	f_{oc} (%)	K_{oc} (Lg^{-1})
Complexe	0,04	18,5	0,2
B34	5,92	27	21,9
Sédiment	0,02	2	1,1

Les fortes différences entre les valeurs de K_{oc} obtenues pour chaque adsorbant testé sont directement liées à leur capacité d'adsorption et à la qualité de la matière organique, *ie* son caractère hydrophobe permettant le piégeage du naphthalène.

L'hypothèse d'un partage du naphthalène entre la phase eau et la phase organique de l'argile organique B34 est plausible car l'application d'une isotherme linéaire à l'adsorption du naphthalène de l'argile organique convient aussi bien que les autres modélisations (coefficient de corrélation de 0,86). De plus, la montmorillonite ne retient pas l'hydrocarbure et la capacité de rétention de la B34 est donc attribuée au surfactant. Sur cette hypothèse de partage, il a été possible de calculer la quantité de naphthalène présente dans le surfactant. Pour un K_p de $5,92Lg^{-1}$ et une concentration à l'équilibre de $15mgL^{-1}$, 88,8mg de naphthalène sont retenus par l'argile organique B34. Sachant que 1gramme de B34 contient 326mg de surfactant dont la densité est de 0,85, 231g de naphthalène sont "solubilisés" dans 1 litre de surfactant.

Les deux modèles, Freundlich et Langmuir ont également été appliqués aux isothermes de désorption, représentant l'équilibre entre la fraction restant adsorbée et la fraction ayant désorbée et maintenant présente dans la phase eau.

Les paramètres de désorption sont regroupés dans le tableau 4.7, et à titre d'exemple, la figure 4.8 montre l'isotherme de désorption (modélisé selon Freundlich) du naphthalène à partir de B34. La courbe de désorption du naphthalène en présence de sédiment est présentée en annexe 10.

Tableau 4.7. Paramètres de Freundlich et de Langmuir pour la désorption du naphthalène

	Freundlich		Langmuir	
	k (Lg ⁻¹)	n	Qm (m _g g ⁻¹)	b
Montmorillonite	-	-	-	-
Complexe	-	-	-	-
B34	10,74	0,76	148	0,067
Sédiment	0,014	1	0,08	14,6

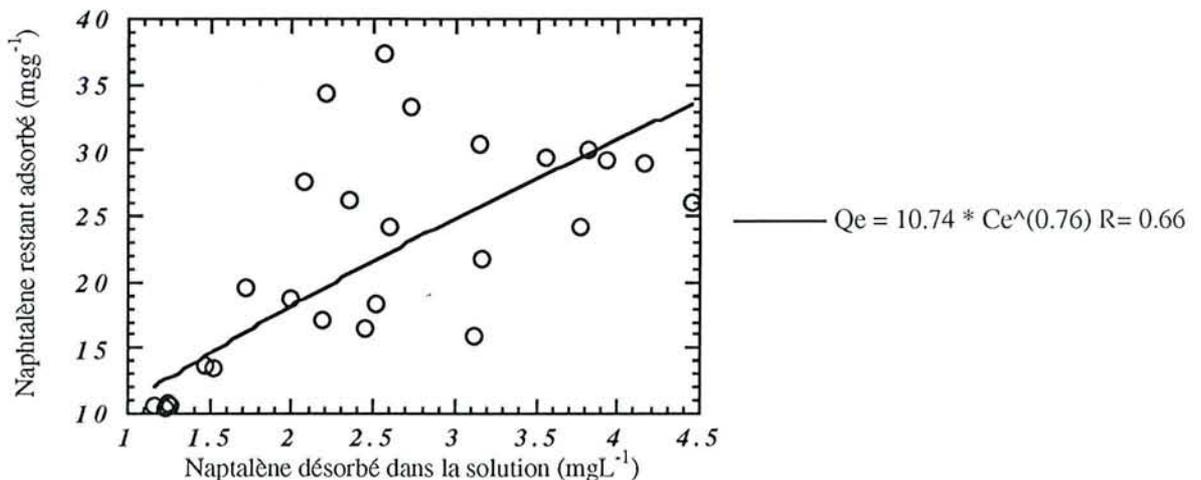


Figure 4.8. Isotherme de désorption du naphthalène à partir de l'argile organique B34 - Ajustement au modèle de Freundlich - Agitation à 500rpm à 30°C

Les corrélations observées pour des ajustements des deux modèles aux isothermes de désorption sont moins satisfaisantes que pour les isothermes d'adsorption. Par exemple, le coefficient de corrélation pour la désorption du naphthalène de B34 ne vaut que 0,66 pour une modélisation selon Freundlich. Ces résultats s'expliquent par une grande dispersion des valeurs dues aux manipulations successives de l'échantillon avant dosage (remise en suspension dans un milieu minéral, 2 centrifugations).

Toutefois, il est intéressant de noter que les paramètres d'adsorption et de désorption du naphthalène avec l'argile organique B34 sont très proches : $Q_m=147\text{mgg}^{-1}$ (adsorption) et $Q_m=148\text{mgg}^{-1}$ (désorption) ou encore $K_{\text{adsorption}}=7,48\text{Lg}^{-1}$ et $K_{\text{désorption}}=10,74\text{Lg}^{-1}$. Ces résultats mènent à conclure que la sorption du naphthalène sur B34 est réversible et que l'équilibre d'adsorption est identique à l'équilibre de désorption.

Par contre, le naphthalène retenu par le sédiment est peu désorbé. La présence d'une matière organique naturelle et complexe permettrait un verrouillage faible et partiel de l'hydrocarbure, tandis que la sorption sur l'argile organique B34 est entièrement réversible.

4.3.4. Gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène

Les fortes quantités de naphthalène adsorbées sur l'argile organique B34 apportent une surcharge de la quantité globale de matière organique adsorbée sur la montmorillonite. L'apport de 147mg de naphthalène par gramme d'argile organique (§4.3.3) soit environ 225mgg^{-1} de montmorillonite doit se traduire par une modification de la structure. Cette hypothèse a été vérifiée par diffraction aux rayons X (Figure 4.9).

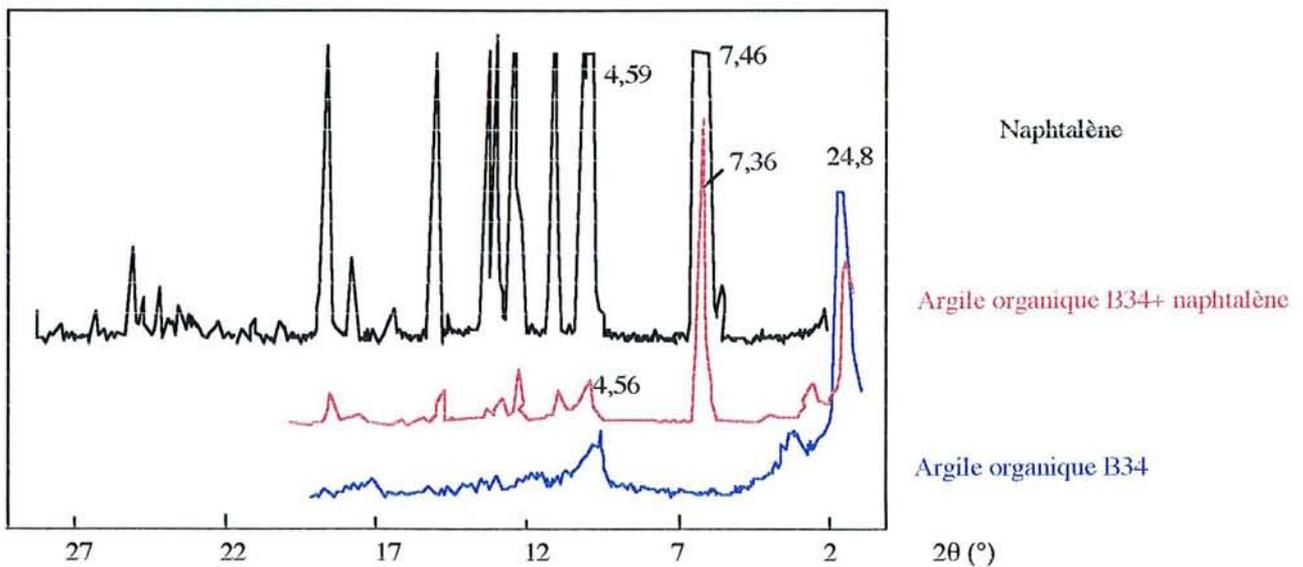


Figure 4.9. Spectre de diffraction X de l'argile organique B34, du naphthalène et de l'argile organique B34 gonflée par la présence de naphthalène

Le naphthalène se trouve sous forme cristallisée pour la préparation des échantillons de B34 contenant du naphthalène (pic à). Or, les cristaux ne sont pas localisés dans l'espace interfoliaire puisqu'on observerait dans ce cas un interstratifié naphthalène / B34.

En effet, l'équidistance des feuillets de montmorillonite sodique, à l'origine de 1,25nm (Bruant, 1986) passe à 2,6nm en présence du tensioactif dans l'argile organique B34. L'ajout de naphthalène provoque un gonflement supplémentaire à 3,8nm. Cet accroissement de 1,3nm suggère une pénétration du naphthalène dans les chaînes alkyle du tensioactif par interactions hydrophobes. Sa présence pourrait réduire l'interpénétration des chaînes alkyles et permettre le gonflement. Cette hypothèse est soutenue par un caractère non cristallin du naphthalène en phase adsorbé qui suggère une forte dispersion des molécules de naphthalène et peu d'interactions entre elles (Schématisation en Figure 4.10).

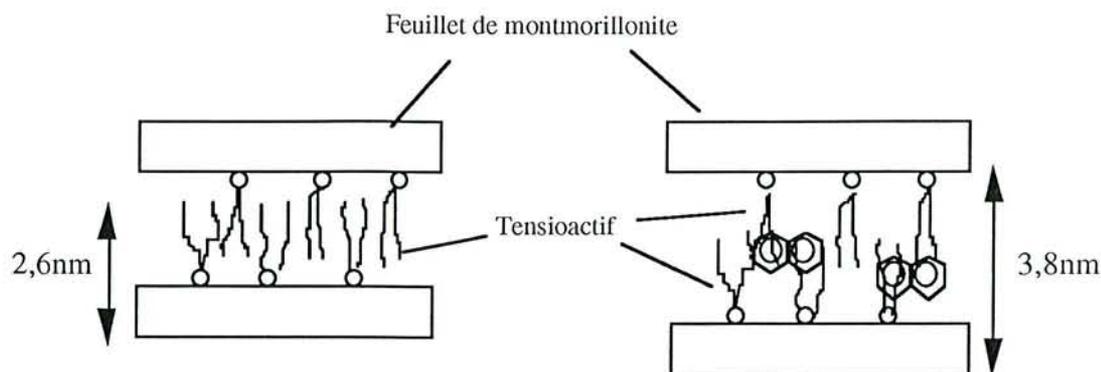


Figure 4.10. Agencement des molécules de tensioactif sur les feuillets de montmorillonite et augmentation de l'espace interfoliaire en présence de naphthalène

4.4. Discussion

Le naphthalène, hydrocarbure polyaromatique, de faible solubilité (33mgL^{-1} à 30°C) et moyennement hydrophobe ($\log K_{ow} = 3,3$) est un composé volatile. La perte par transfert à l'air est "à priori" prévisible puisque la cinétique de volatilisation suit une loi du premier ordre (une constante moyenne k a été calculée égale à $0,012\text{h}^{-1}$). Une perte moyenne de 20% par ouvertures successives des réacteurs, non négligeable comparativement aux 5% de pertes de Guerin et Boyd (1992) a été maîtrisée par la mise en place de témoins.

L'adsorption du naphthalène a été testée sur cinq supports de nature différente : une argile, deux argiles organiques, un sédiment et de la biomasse bactérienne. La sorption du naphthalène est un mécanisme rapide puisque quel que soit le support, l'équilibre entre le phase eau et la phase solide aussi bien pour l'adsorption que pour la désorption est atteint en de 2 heures environ à 30°C . Mihelcic et Luthy (1991) montrent également que l'adsorption et la désorption du naphthalène sont réalisés en moins de 1h30 sur un sol à 25°C . D'autres composés s'adsorbent également rapidement sur des matériaux adsorbants : 50 minutes pour l'adsorption du pyrène sur des sédiments de lac (Stapleton *et al.*, 1994), 40 minutes pour le phénol et l'aniline sur une argile organique (Zhang et Sparks, 1993).

Les supports testés montrent des degrés de rétention différents et peuvent être classés en trois catégories : un support non adsorbant (la montmorillonite, $K_p=0\text{mLg}^{-1}$), deux supports qualifiés de faibles adsorbants (le complexe, $K_p=40\text{mLg}^{-1}$ et le sédiment, $K_p=20\text{mLg}^{-1}$), et un support fortement adsorbant (l'argile organique B34, $K_p=5920\text{mLg}^{-1}$).

Le fait que le naphthalène ne s'adsorbe pas sur la montmorillonite de sodium s'explique par un caractère exclusivement hydrophile de l'argile, tandis que le naphthalène est relativement hydrophobe ($\log K_{ow}=3,3$). De surcroît, la montmorillonite ne contient pas de carbone organique (§3.4.1).

Les deux supports, complexe montmorillonite/polyacrylamide et sédiment présentent des

capacités d'adsorption du même ordre de grandeur. Les valeurs de coefficients de partage K_p sont en accord avec les données de la littérature. Par exemple, Guerin et Boyd (1992) ont mesuré des coefficients de partage du naphthalène compris entre 4,56 et 28,93mLg⁻¹ pour 4 sols en teneur en carbone organique compris entre 0,76% et 5,36%. Le sédiment (2% de carbone organique) a une coefficient de 20mLg⁻¹ et le complexe de 40mLg⁻¹. Zhang *et al.*, (1995) ont déterminé un K_p de 6,5mLg⁻¹ pour le partage du naphthalène dans un sol contaminé par des hydrocarbures.

L'argile organique B34 présente des propriétés de rétention beaucoup plus marquées puisque la valeur de K_p est très élevée : 5920mLg⁻¹. Cette forte capacité de rétention s'explique par le fait que l'argile organique B34 contient une teneur élevée de carbone organique (27%). De plus, la nature de la "matière organique" modélisée par le tensioactif est très hydrophobe. Les molécules de tensioactif adsorbé sur l'argile présentent deux chaînes linéaires à 18 carbones conférant à l'argile organique un caractère hydrophobe. L'adsorption du naphthalène par la B34 peut alors être attribuée à la présence du tensioactif et non à celle de l'argile. Il s'agit certainement d'un partage entre la phase eau et le tensioactif constituant la phase organique. En effet, un modèle linéaire de partage tracé sur une gamme de concentrations élevées (de zéro à la moitié de la solubilité), convient aussi bien qu'un modèle exprimant une saturation (Langmuir). De surcroît, un calcul de solubilisation du naphthalène dans le tensioactif aboutit à une concentration de 231g naphthalène L⁻¹ de tensioactif valeur exprimant une forte solubilité dans les solvants organiques. A titre comparatif, le naphthalène se solubilise au moins à 66gL⁻¹ dans l'octanol, d'après son K_{ow} de 1995.

La normalisation des coefficients de partage K_p par rapport à la fraction de carbone organique (f_{oc}), noté K_{oc} , permet de caractériser une adsorption d'une molécule par la matière organique. Les valeurs calculées pour le sédiment et le complexe ($\log K_{oc}=3$ et $\log K_{oc}=2,3$ respectivement) sont proches de celles de Guerin et Boyd (1992) comprises entre 2,56 et 2,78. Par contre, la B34 donne une valeur, exprimée en log, beaucoup plus élevée : 4,34.

Kibbey et Hayes (1993), lors de tests d'adsorption du phénanthrène sur une silice couverte de tensioactif cétyltriméthylammonium - un système très semblable à celui de B34 (montmorillonite échangée de diméthyl-dioctadecyl ammonium) - ont trouvé une valeur de K_{oc} pour le phénanthrène ($\log K_{oc}=5,1$) environ 6,5 fois plus fort que les valeurs de K_{oc} du phénanthrène habituellement calculées pour des sols ou sédiments. A l'instar de Kibbey et Hayes (1993), le K_{oc} déterminé pour B34 est 20 à 100 fois plus élevé que les K_{oc} calculés pour les sols et sédiments. Ces variations d'essai à essai s'expliquent par la différence des caractéristiques qualitatives de la matière organique. Rutherford *et al.* (1992) rappellent que le calcul du K_{oc} nécessite une hypothèse d'adsorption uniquement par l'intermédiaire de la matière organique. De plus, la qualité de la matière organique, *i.e.* sa plus ou moins grande hydrophobicité, sa capacité d'échange cationique, son degré d'humification, jouent un rôle important (Doussset *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1994) et expliquent des différences pouvant varier d'un facteur 40 (Rutherford *et al.*, 1992).

4.5. Conclusions

Le comportement physico-chimique du naphthalène a été testé de façon à évaluer son devenir en solution et en présence de particules supports. La perte par volatilisation de l'hydrocarbure (suivant une loi du premier ordre) présent sous forme dissoute dans un milieu aqueux a été appréhendée en réalisant un témoin "volatilisation" déduit à chaque valeur "essai".

Les particules support ont pu être classées en trois catégories en fonction de leur capacité de rétention du naphthalène : un support minéral hydrophile, la montmorillonite, n'adsorbant pas le naphthalène, ($K_p=0\text{mLg}^{-1}$), deux matériaux, bien que de nature différente, le complexe montmorillonite/polyacrylamide et le sédiment qui retiennent le naphthalène dans des proportions semblables ($K_p=40\text{mLg}^{-1}$ et $K_p=20\text{mLg}^{-1}$ respectivement) et un adsorbant qui présente une affinité environ 200 fois plus grande que ces deux derniers ($K_p=5920\text{mLg}^{-1}$).

D'un point de vue global, la sorption du naphthalène est un processus rapide puisque les équilibres sont atteints en 2 heures. La désorption étant rapide ne sera pas a priori le terme limitant la biodisponibilité. Sa réversibilité indique que le naphthalène est relargué dans la phase aqueuse lorsqu'il est replacé dans un milieu exempt de naphthalène. L'équilibre d'adsorption est identique à celui de désorption excepté pour le sédiment.

Ces quatre matériaux servent de support au naphthalène et aux microorganismes dans le cadre de la deuxième étape sur l'étude de la biodisponibilité du naphthalène. Le chapitre suivant traite de la biodégradation du naphthalène par la biomasse *Burkholderia cepacia* en présence de ces quatre matériaux sous forme de suspension.

4.6. Références bibliographiques

- AL-BASHIR B., T. CSEH, R. LEDUC and R. SAMSON, 1990,
Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions,
Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 414-419.
- BOTTERO J.Y., K. KHATIB, F. THOMAS, K. JUCKER, J.L. BERSILLON and J. MALLEVIALLE, 1994,
Adsorption of atrazine onto zeolites and organoclays in the presence of background organics,
Wat. Res., **2**, 483-490.
- BREURE A.M., F. VOLKERING and J.G. VAN ANDEL, 1991,
Microbial conversion of naphthalene, phenanthrene, and anthracene,
International Symposium, Environmental Biotechnology, 22-25 April 1991, Oostende, Belgium.
- BUITRON G. and B. CAPDEVILLE, 1993,
Uptake rate and mineralization of hexadecane and naphthalene by a mixed aerobic culture,
Wat. Res., **27**, 847-853.
- CERNIGLIA C.E., 1993,
Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons,
Current Option in Biotechnology, **4**, 331-338.
- DOUSSET S., C. MOUVET and M. SCHIAVON, 1994,
Sorption of terbuthylazine and atrazine in relation to the physico-chemical properties of three soils,
Chemosphere, **28**, 467-476.
- FETTER C.W., 1993,
Transformation, retardation and attenuation of solutes, Chapter three,
in Contaminant hydrogeology, Maxwell Publishing Company, New York, 115-162.
- FU M.H., H. MAYTON and M. ALEXANDER, 1994,
Desorption and biodegradation of sorbed styrene in soil and aquifer solids,
Environ. Toxicol. Chem., **13**, 749-753.
- GUERIN W.F. and S.A. BOYD, 1992,
Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species,
Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1142-1152.
- GOTTSCHALK G., 1986,
Bacterial Metabolism, Second Edition, Springer-Verlag, New York.
- Handbook of Chemistry and Physics, 1990-1991,
71st edition, D.R. Lide (ed), CRC Press, Ann Arbor.
- HEGEMAN W.J.M., C.H. VAN DER WEIJDEN and J.P.G. LOCH, 1995,
Sorption of benzo[a]pyrene and phenanthrene on suspended harbor sediment as a function of concentration and salinity; a laboratory study using the cosolvent partition coefficient,
Environ. Sci. Technol., **29**, 363-371.
- KARICKHOFF S.W., 1980,
Sorption kinetics of hydrophobic pollutants in natural sediments, Chapter 11,
in Contaminants and Sediments, Anna Harbor Science, A. Backer Edt, Michigan, 193-205.

- KARICKHOFF S.W., 1981,
Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils,
Chemosphere, 10, 833-846.
- KHATIB K., 1994,
Structure et réactivité des argiles organiques utilisées pour l'élimination des micropolluants en milieu aqueux,
Thèse de l'INPL, soutenue à Vandoeuvre le 29 septembre 1994, 206pages.
- KIBBEY T.C.G. and K.F. HAYES, 1993,
Partitioning and UV adsorption studies of phenanthrene on cationic surfactant-coated silica,
Environ. Sci. Technol., 27, 2168-2173.
- KUKKONEN J. and A. OIKARI, 1991,
Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material,
Wat. Res., 25, 455-463.
- LI Y. and G. GUPTA, 1994,
Adsorption/desorption of hydrocarbons on clay minerals,
Chemosphere, 28, 627-638.
- LUTHY R.G., D.A. DZOMBAK, C.A. PETERS, S.B ROY, A. RAMASWAMI, D.V. KAKLES and B.R. NOTT, 1994,
Remediating tar-contaminated soils at manufactured gas plant sites,
Environ. Sci. Technol., 28, 266-276.
- MIHELICIC J.R. and R.G. LUTHY, 1991,
Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions,
Environ. Sci. Technol., 25, 169-177.
- MILLER M.E. and M. ALEXANDER, 1991,
Kinetics of bacterial degradation of benzylamine in a montmorillonite suspension,
Environ. Sci. Technol., 25, 240-245.
- MURPHY C.M., J.M. ZACHARA and S.C. SMITH, 1990,
Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds,
Environ. Sci. Technol., 24, 1507-1516.
- MURPHY C.M., J.M. ZACHARA , S.C. SMITH, J.L. PHILLIPS and T.W. WIETSMA, 1994,
Interaction of hydrophobic organic compounds with mineral-bound humic substances, Environ. Sci. Technol., 28, 1291-1299.
- RUTHERFORD D.W, C.T. CHIOU and D.E. ELKE, 1992,
Influence of soil organic matter composition on the partition of organic compounds,
Environ. Sci. Technol., 26, 336-340.
- SCHWARZENBACH R.P., P.H. GSCHWEND and D.M. IMBODEN, 1993,
Environmental organic chemistry,
John Wiley & Sons inc., New York.
- SCOW K.M. and M. ALEXANDER, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : experimental results with synthetic aggregates,
Soil Sci. Soc. Am. J., 56, 128-134.

SCOW K.M. and J. HUTSON, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : theoretical considerations,
Soil Sci. Soc. Am. J., 56, 119-127.

SIGG L., W. STUMM and P. BEHRA, 1992,
Chimie aux interfaces, Chapitre 10,
in Chimie des milieux aquatiques, Masson, Paris, 307-344.

STAPLETON J.M., J.R. MIHELICIC and D.R. LUEKING, 1994,
Adsorption and desorption kinetics of pyrene onto a Great Lakes sediment,
J. Great Lakes Res., 20, 561-568.

WEBER J.B. and H.D. COBLE, 1968,
Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays,
J. Agri. Food Chem., 16, 475-478.

ZHANG P.C. and D.L. SPARKS, 1993,
Kinetics of phenol and aniline adsorption and desorption on an organo-clay,
Soil Sci. Soc. Am. J., 57, 340-345.

ZHANG W., E. BOUWER, L. WILSON and N. DURAN, 1995,
Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms,
in Wat. Sci. Technol., 31, 1-14.

ZHOU J.L., S. ROWLAND, R. AUZI, C. MANTOURA and J. BRAVEN, 1994,
The formation of humic coatings on mineral particles under simulated estuarine conditions-a
mechanistic study,
Wat. Res., 28, 571-579.

CHAPITRE 5

BIODEGRADATION DU NAPHTALENE EN PRESENCE DE SUSPENSIONS ARGILEUSES

Chapitre 5. Biodégradation du naphthalène en présence de suspensions argileuses	100
5.1. Introduction	100
5.2. Protocole expérimental.....	102
5.2.1. Biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite.....	102
5.2.1.1. Biodégradation du naphthalène en présence de 0,5gL ⁻¹ de montmorillonite.....	102
5.2.1.2. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de montmorillonite.....	103
5.2.2. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe argile/polyacrylamide	103
5.2.2.1. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de complexe	103
5.2.2.2. Biodégradation du naphthalène en présence de polyacrylamide .	103
5.2.3. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34.....	104
5.2.3.1. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations en B34	104
5.3.3.2. Influence de la concentration initiale en naphthalène.....	104
5.3.3.3. Essais de biodégradabilité du tensioactif.....	105
5.3.4. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment	105
5.3. Résultats.....	106
5.3.1. Biodégradation du naphthalène en milieu aqueux.....	106
5.3.2. Biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite.....	108
5.3.3. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe montmorillonite/polyacrylamide	110
5.3.4. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34.....	112
5.3.5. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment de rivière	118
5.4. Discussion.....	121
5.5. Conclusion	124

Chapitre 5. Biodégradation du naphthalène en présence de suspensions argileuses

5.1. Introduction

Hydrocarbure polyaromatique, le naphthalène est un composé dégradé par voie biologique avec des microorganismes diversifiés tels que les algues, les champignons ou les bactéries (Cerniglia, 1993).

Les voies de dégradation bactériennes du naphthalène ont été étudiées principalement chez le genre *Pseudomonas* (Barnsley, 1976; Kiyohara and Nagao, 1978). La biodégradation du naphthalène nécessite l'association et l'incorporation de la molécule d'hydrocarbure dans la cellule bactérienne. Le naphthalène doit passer la barrière membranaire et l'attaque enzymatique, processus intracellulaire, a lieu à l'intérieur de la cellule (Smith, 1994). L'attaque initiale est réalisée en présence d'oxygène par l'intermédiaire d'une dioxygénase, dont la cible caractéristique est le noyau aromatique, et conduit à une oxydation du naphthalène en *cis*-1,2-naphthalène dihydrodiol (Figure 5.1). Cette étape nécessite l'implication de 2 atomes d'oxygène (Bouwer, 1992; Pelmont, 1993) et par conséquent la présence d'oxygène dissous dans le milieu.

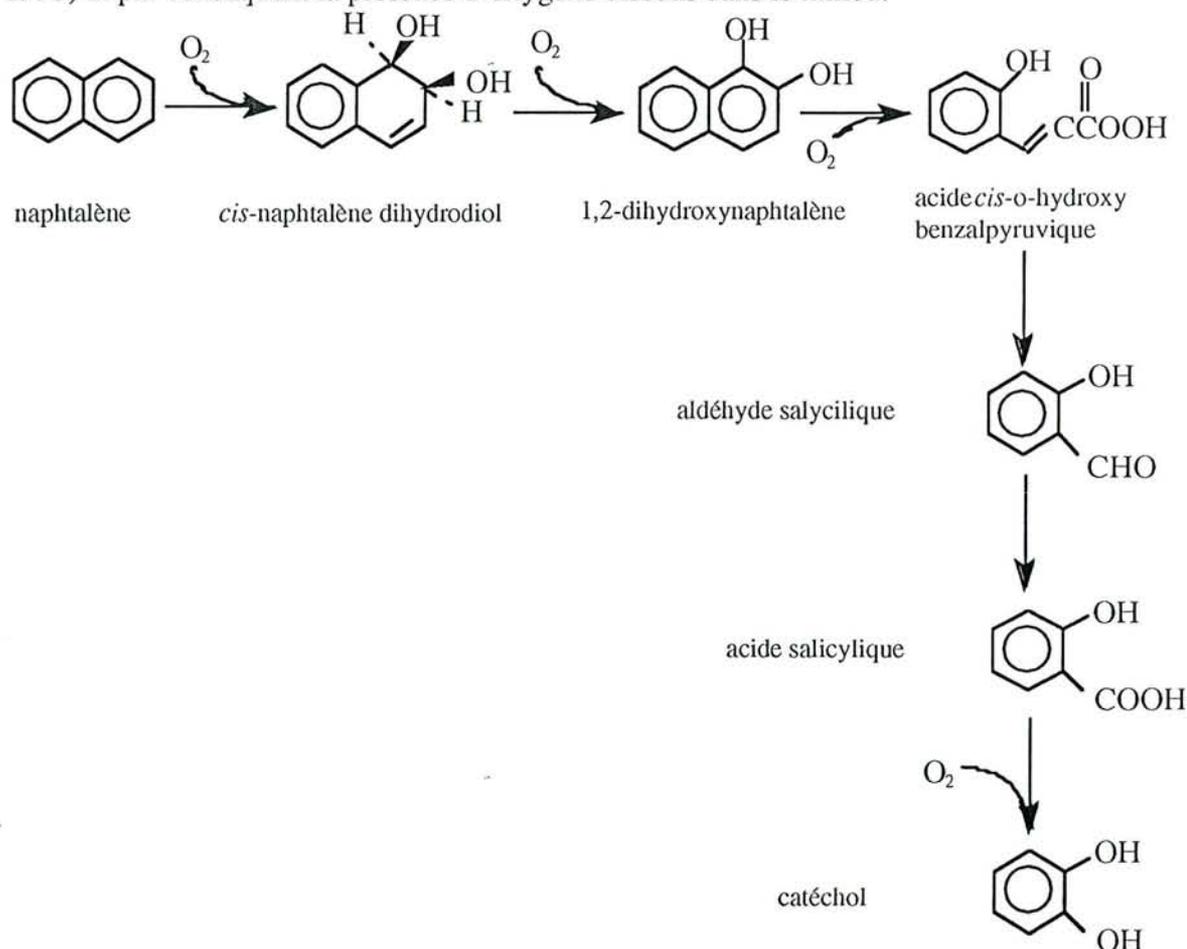


Figure 5.1. Voie d'oxydation du naphthalène en catéchol par des bactéries en milieu aérobie (d'après Kiyohara and Nagao, 1978)

Une dégradation dans des conditions de dénitrification comme l'ont réalisé AlBashir *et al.*, (1990) ou encore Mihelcic and Luthy (1991) ne se comprend que s'il existe un résiduel en oxygène dans le milieu pour induire la dioxygénase.

Le *cis*-1,2-naphtalène dihydrodiol formé donne, par l'action d'une déshydrogénase le 1,2-dihydroxynaphtalène qui après plusieurs étapes enzymatiques est dégradé en acide salicylique puis en catéchol.

Selon le type de microorganismes, mais aussi selon les composés inducteurs (nature du substrat) (Barnsley, 1976), le catéchol subit lui-même un clivage dit *méta* ou *ortho* pour former des sous-produits qui intègrent le cycle de l'acide citrique (Figure 5.2).

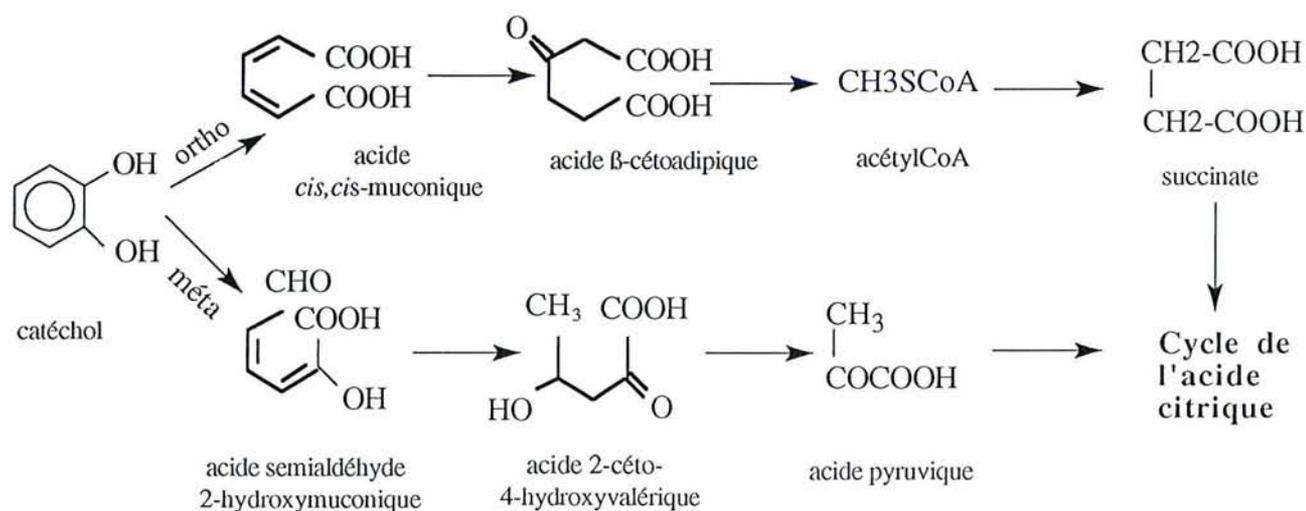


Figure 5.2. Clivages *ortho* ou *méta* du catéchol (d'après Barnsley, 1976 et Gottschalk, 1986)

Les études génétiques ont montré que la capacité d'une souche bactérienne à dégrader le naphthalène peut être d'origine chromosomique ou encore portée par un plasmide. Par exemple, *Pseudomonas putida* PpG7 (ATCC17485) possède un codage plasmidique de l'enzyme de dégradation du naphthalène et en conséquence la souche peut perdre spontanément le phénotype Nah⁺, tandis que la souche PpG63 (ATCC 17484) posséderait un gène chromosomique (Dunn et Gunsalus, 1973).

Les cinétiques de dégradation du naphthalène en présence de sol ou de sédiment sont variables, les temps de demi-vie s'échelonnant de quelques heures à plusieurs jours (Bower, 1992; Howard, 1989; Howard *et al.*, 1991). Les exemples de cinétiques rapides (quelques heures), réalisées avec des populations bactériennes adaptées et avec des concentrations suffisamment grandes, sont données pour des expériences réalisées dans des conditions d'aérobiose (Buitron et Capdeville, 1994; Guerin et Boyd, 1992) et les cinétiques plus lentes pour les dégradations en conditions de dénitrification (AlBashir *et al.*, 1990; Mihelcic et Luthy, 1991).

La limitation de la biodégradation de composés organiques dans des sols, des sédiments,

ou simplement en présence de particules solides en suspension est due, dans la plupart des cas, à une limitation de leur biodisponibilité. Cette diminution de biodisponibilité est directement liée selon les auteurs soit à une rétention du substrat par adsorption (Weber et Coble, 1968) soit à une diffusion plus lente dans les pores des particules (Ramaswami *et al.*, 1992). De plus, à proximité de supports solides, les microorganismes ont tendance à se fixer et former des agrégats jouant un rôle d'obstacle aux éléments nutritifs (Berthelin *et al.*, 1994; Chotte *et al.*, 1992).

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons aux cinétiques de dégradation du naphthalène en présence de particules argileuses et de sédiment sous forme de suspensions *i.e.* dans des systèmes où l'adsorption est nulle ou très rapidement réversible (Chapitre 4) afin de quantifier sa biodisponibilité. Les conditions testées sont celles utilisées pour l'étude du comportement du naphthalène dans le chapitre 4. Les microorganismes sollicités sont des bactéries isolées à partir de culture sur naphthalène. La souche a été identifiée comme *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* (§3.1) (Yabuuchi *et al.*, 1992). *Burkholderia cepacia* est un hôte commun des environnements aquatiques (Wise *et al.*, 1995) et a été adapté à la dégradation du naphthalène.

5.2. Protocole expérimental

La totalité des essais de biodégradation du naphthalène par une souche pure adaptée à l'hydrocarbure, *Burkholderia cepacia* ont été réalisés à 30°C en réacteurs batch sous agitation magnétique à 30°C.

5.2.1. Biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite

5.2.1.1. Biodégradation du naphthalène en présence de 0,5gL⁻¹ de montmorillonite

12 flacons Téflon de 250mL de capacité (Osi), fermés à l'aide de bouchons à vis en téflon sont numérotés de 1 à 12. Les flacons 1 à 6 contenant 50mg de montmorillonite de sodium (§3.4.1) et les autres sans montmorillonite sont autoclavés. Après refroidissement, sont ajoutés stérilement 100mL de solution stérile à base de naphthalène (§3.3).

Les 12 flacons subissent une sonication de 3 minutes à puissance maximale dans un bain (Bioblock) et sont agités sur l'agitateur magnétique multipostes Variomag 20W (Bioblock) pendant 12 heures à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) de façon à disperser l'argile.

Au temps $t = 0$, la suspension bactérienne adaptée de *Burkholderia cepacia* (§3.9) est ajoutée au milieu naphthalène dans les réacteurs 1, 2, 3 et 7, 8, 9. Les autres flacons non inoculés servent de témoin abiotique. Un prélèvement de la suspension bactérienne est effectué afin de pratiquer un étalement sur gélose nutritive complétementée en naphthalène coulée en boîte de Pétri

afin de connaître le nombre exact de bactéries cultivables (§3.1.3).

De façon régulière, sont prélevées stérilement environ 10mL de suspension de bactéries + de montmorillonite. Les échantillons sont centrifugés dans des tubes Téflon à 45000g pendant 10 minutes à une température de 4°C. Le surnageant est récupéré et soumis à un dosage en HPLC du naphthalène en solution (§3.6).

De même, 1mL de la suspension est dilué dans du sérum physiologique stérile et étalé sur boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive afin de déterminer le nombre de bactéries cultivables (§3.1.3).

5.2.1.2. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de montmorillonite

Ces essais de biodégradation du naphthalène en fonction de la concentration en montmorillonite sont réalisés de façon identique au protocole 5.2.1.1.

Les concentrations de montmorillonite employées sont 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5gL⁻¹. Seule la concentration de 0,025gL⁻¹ est réalisée en simplicat, les autres étant réalisés en duplicat. A t = 0, 2.10⁶ bactéries cultivables mL⁻¹ (UFC) de *Burkholderia cepacia* sont introduites dans chaque flacon essai.

Le suivi de la concentration en naphthalène est réalisé en fonction du temps après centrifugation par dosage en HPLC (§3.6) ainsi que le nombre de bactéries viables (§3.1.3).

5.2.2. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe argile/polyacrylamide

5.2.2.1. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de complexe

Le protocole expérimental est calqué sur celui du paragraphe 5.2.1.1. Des concentrations de complexe de 0; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 gL⁻¹ sont testées. Le complexe montmorillonite / polyacrylamide ne supportant pas, les quantités sont ajoutées stérilement dans les flacons contenant 100mL de solution de naphthalène (§3.8). L'inoculation avec *Burkholderia cepacia* est réalisée après 24 h d'agitation des suspensions pour atteindre l'équilibre d'adsorption du naphthalène sur le complexe.

5.2.2.2. Biodégradation du naphthalène en présence de polyacrylamide

Les essais sont réalisés de la même façon qu'au paragraphe 5.2.2.1. 12 mg de

polyacrylamides solubilisés (Hoechst) sont ajoutés après stérilisation des flacons à 100mL de solution. Les 12mg représentent la quantité de polyacrylamides présents dans les 25mg de complexe. Après ensemencement par $4,5 \cdot 10^6$ UFCmL⁻¹ de *Burkholderia cepacia*, un suivi du naphthalène et des microorganismes est réalisé.

5.2.3. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34

5.2.3.1. Biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations en B34

Ces essais de biodégradation du naphthalène en fonction de la concentration en argile organique B34 ont pour but de montrer l'influence de la quantité de naphthalène adsorbé sur l'argile réduisant ainsi la concentration en solution.

Des témoins abiotiques contenant l'argile organique B34 servent de témoins de volatilisation. Les concentrations de B34 employées sont 0; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 et 1gL⁻¹. Chaque concentration est testée en duplicat.

A $t = 0$, $1,5 \cdot 10^6$ bactéries cultivables mL⁻¹ (UFC) sont introduites dans chaque flacon essai.

Le suivi de la concentration en naphthalène est réalisé en fonction du temps par dosage en HPLC (§3.6). L'évolution du naphthalène adsorbé sur l'argile organique B34 est suivie par HPLC après désorption dans une solution de méthanol (§3.7) et celui des microorganismes par numération du nombre de bactéries cultivables (§3.1.3).

5.3.3.2. Influence de la concentration initiale en naphthalène

Cet essai de biodégradation a pour but de vérifier que la concentration initiale de naphthalène en solution (variant en fonction de la concentration en B34) et modifiant ainsi le rapport S_0/X_0 (concentration initiale en substrat par rapport à la concentration initiale en microorganismes) n'a dans nos expériences qu'une influence négligeable.

Des essais de biodégradation ont été réalisés en triplicats sur chaque essai avec :

- (1) 0gL⁻¹ de B34 et concentration initiale en naphthalène de 14,2mgL⁻¹
- (2) 0gL⁻¹ de B34 et une concentration initiale en naphthalène de 8,4mgL⁻¹
- (3) 0,1gL⁻¹ de B34 et une concentration de naphthalène en solution de 7,1gL⁻¹, les autres 7,1gL⁻¹ de naphthalène étant sorbés sur l'argile organique.

$1,5 \cdot 10^6$ UFCmL⁻¹ sont introduites dans chaque flacon essai au temps $t=0$. Les témoins sont constitués de la même suspension d'argile organique, mais stérile. Tous les flacons sont agités à 500 tours par minutes par de barreaux magnétiques à une température de 30°C.

Le suivi de la concentration en naphthalène est réalisé en fonction du temps par dosage en HPLC (§3.6). L'évolution du naphthalène adsorbé sur l'argile organique B34 est suivie par HPLC

après désorption dans une solution de méthanol (§3.7) et celui des microorganismes par numération du nombre de bactéries cultivables (§3.1.3).

5.3.3.3. Essais de biodégradabilité du tensioactif

Les essais de biodégradabilité du tensioactif (bromure de diméthyl-dioctadecanoic ammonium $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}]_2\text{NBr}(\text{CH}_3)_2$, $M=630,96$ g/mole, Aldrich Chimie) sont réalisés en réacteurs batchs.

Quatre flacons Téflon de 250mL de capacité contenant 100mL de milieu minéral (§3.2) sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes. 50mg de tensioactif sont introduits dans les flacons. 500mgL^{-1} représentent la concentration de tensioactif présente pour 1gL^{-1} de B34 (549mg de tensioactif sont adsorbés par gramme de bentonite). Deux flacons servent de témoins abiotique, les autres sont inoculés avec une suspension de *Burkholderia cepacia* (§3.9).

Les flacons contenant 100mL de suspension bactérienne sont placés sur la table d'agitation (150 tours par minute) à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

A des temps réguliers, un prélèvement de chaque suspension est effectué stérilement. Le surfactant n'étant pas soluble dans l'eau à 30°C (présence de cristaux), sa biodégradation est appréciée par l'évolution des bactéries cultivables (§3.1.3).

5.3.4. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment

Des témoins abiotiques contenant le sédiment additionné de 40mgL^{-1} de chlorure mercurique servent de témoins de volatilisation. Les concentrations de sédiment employées sont 0; 0,5; 5; 10, 25 et 50gL^{-1} . Chaque concentration est testée en duplicat pour l'essai avec *Burkholderia cepacia* et en simplicat pour le témoin contenant la même quantité de sédiment que dans l'essai correspondant.

Au temps $t = 0$, 10^6 UFCmL⁻¹ (*Burkholderia cepacia* cultivables sur milieu gélosé, §3.1.3) sont introduites dans chaque flacon essai.

Le suivi de la concentration en naphthalène en solution de même que la quantité de bactéries présentes dans le sédiment et inoculées (*Burkholderia cepacia*) est réalisé en fonction du temps.

5.3. Résultats

5.3.1. Biodégradation du naphthalène en milieu aqueux

Un essai de biodégradation du naphthalène en solution ($C_i=18,3\text{mgL}^{-1}$) par *Burkholderia cepacia* a été réalisé en réacteur batch à 30°C. La figure 5.3 montre l'évolution de la concentration de l'hydrocarbure dans les flacons témoins abiotiques, (témoin naphthalène), la concentration de naphthalène mesurée dans l'essai de biodégradation (naphthalène) et la concentration de naphthalène corrigée de la volatilisation selon le paragraphe 3.11.4. Chaque point est une moyenne sur 3 valeurs et les données brutes sont données en annexe 13.

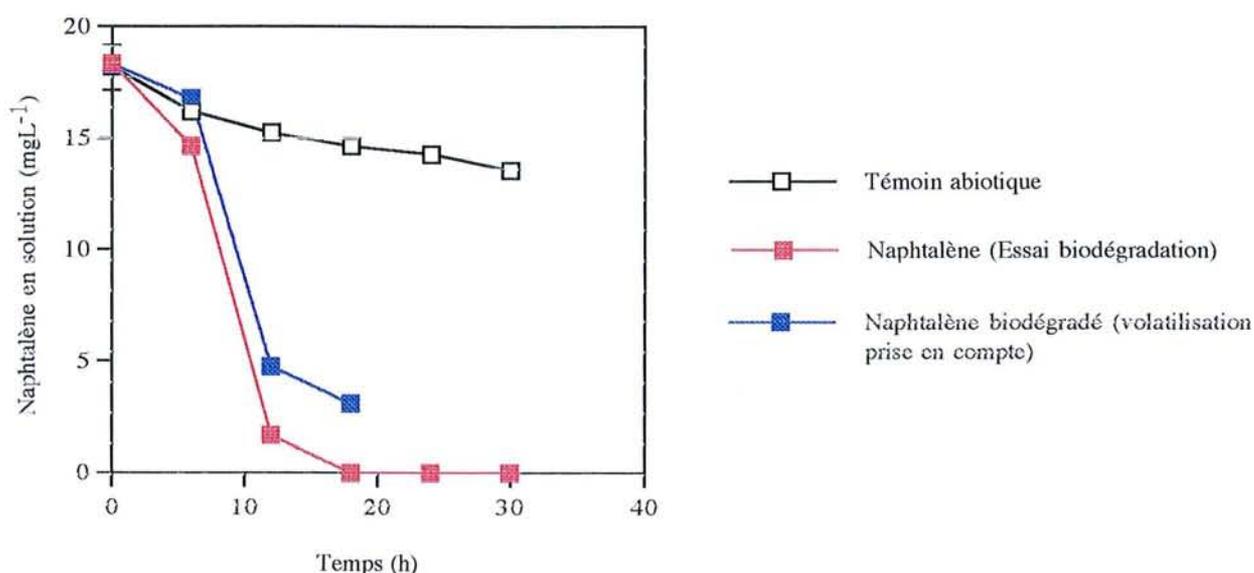


Figure 5.3. Evolution de la concentration en naphthalène en fonction du temps en présence de *Burkholderia cepacia* sous agitation magnétique (500rpm) à 30°C : Témoin de volatilisation, valeurs brutes et valeurs corrigées de la volatilisation

Les valeurs de concentration de naphthalène corrigé de la volatilisation ont été calculées en appliquant le modèle décrit au paragraphe 3.11.4. Ce modèle compense les valeurs brutes mesurées de la volatilisation qui suit une loi du premier ordre (Témoin volatilisation réalisé à chaque expérience) globalement présentes au paragraphe 4.3.1, à la courbe ajustée aux valeurs de la cinétique de biodégradation. Cependant, une dérive du modèle négligeable en début d'expérience, mais gênante en fin de biodégradation, résulte du fait que les vitesses de biodégradation sont beaucoup plus grandes que les vitesses de volatilisation. Ainsi, la quantité de naphthalène perdue par volatilisation et ajoutée à la quantité de naphthalène restant, entraîne une surestimation, car si cette quantité de naphthalène avait été effectivement présente, elle aurait elle aussi subi l'attaque microbienne. Pour ces raisons, toutes les courbes de biodégradation seront présentées dans les paragraphes suivants non compensées de la volatilisation. Par contre, la volatilisation est prise en compte pour la détermination des vitesses de biodégradation et des

constantes cinétiques calculées selon le paragraphe 3.11.5.

Une diminution de la concentration de naphthalène est visualisée parallèlement à une augmentation du nombre de bactéries cultivables (Unité Formant Colonie UFCmL⁻¹) (Figure 5.4). Cette diminution du substrat est principalement due à une biodégradation par *Burkholderia cepacia*, bien qu'une perte par volatilisation de 15% soit observée en 30 heures.

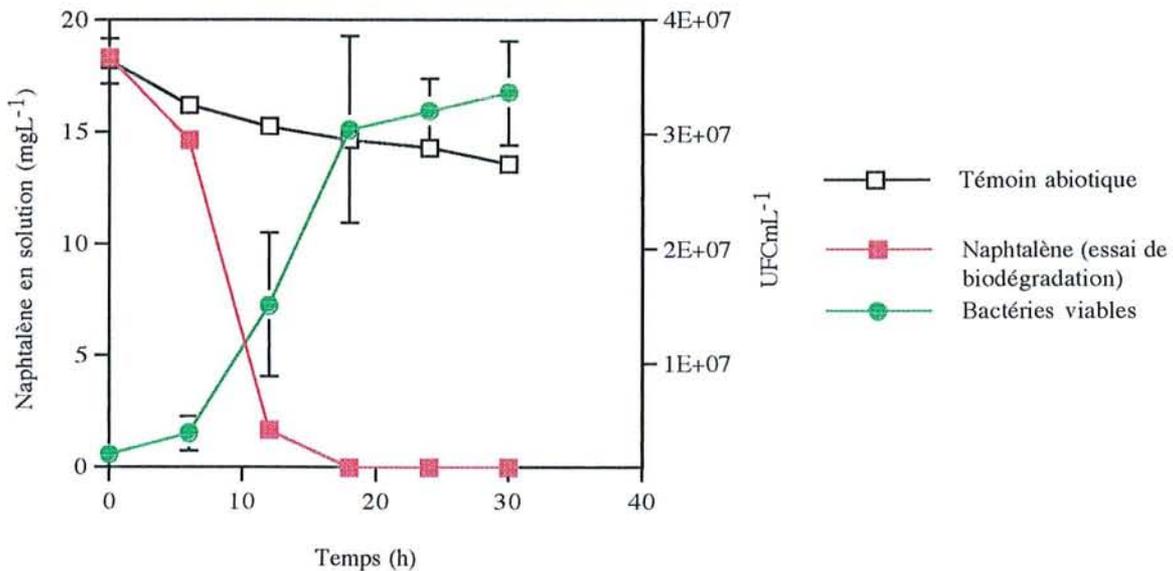


Figure 5.4. Evolution de la concentration en naphthalène dissous et de la concentration de *Burkholderia cepacia* (UFCmL⁻¹) en fonction du temps

Le taux de croissance calculé à partir de cette expérience est de $\mu = 0,1h^{-1}$ et la vitesse de consommation maximale de l'hydrocarbure est de 1,4mg de naphthalène par litre et par heure. La consommation de 17mg de carbone par litre de solution a permis la production en 24 heures de $3 \cdot 10^7$ UFC/mL⁻¹. Sur l'hypothèse qu'une bactérie possède 50% de carbone et qu'une bactérie de *Burkholderia cepacia* pèse 0,2pg, 3mg de carbone cellulaire ont été produits pour 17mg de carbone consommé. Le rapport $Y_{cellulaire}$ encore appelé taux de conversion cellulaire est égal à 0,17, ce qui signifie qu'environ 80% du carbone est transformé en CO₂. Les paramètres caractérisant la souche bactérienne sont repris dans le tableau 5.1.

Ce faible taux de conversion $Y_{UFC} = 0,17$ est sous estimé car il est calculé à partir d'UFC et non du nombre total de bactéries. De plus, cette faible valeur peut s'expliquer par l'hypothèse que le milieu nutritif est minimum. La pénurie d'éléments nutritifs trop dilués (§3.2) oblige les cellules à consommer une énergie supplémentaire en vue de consommer le substrat naphthalène.

Tableau 5.1. Caractéristiques de *Burkholderia cepacia* en croissance sur naphthalène comme seule source de carbone à 30°C

Taux de croissance μ (h^{-1})	0,1
Taux de conversion Y_{UFC}	0,17
Vitesse max de consommation du naphthalène ($\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$)	1,4

5.3.2. Biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite

Dans une seconde étape, la biodégradation du naphthalène a été réalisée en présence de particules de montmorillonite sodique (§5.2.1). La figure 5.5 montre l'évolution du naphthalène en présence et en l'absence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite (Valeurs brutes en Annexe 14).

En présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite sodique, la cinétique de biodégradation du naphthalène est sensiblement différente de celle sans montmorillonite. Ainsi, la vitesse maximale de dégradation est réduite à $0,64$ ($0,03$) $\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ en présence de particules contre $0,84$ ($0,07$) $\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$ sans argile. Pour une concentration bactérienne initiale de 10^7 ($0,6 \cdot 10^7$) UFCmL^{-1} , une faible croissance non significative a été observée : la concentration bactérienne finale a été établie égale à $1,45 \cdot 10^7$ ($0,45 \cdot 10^7$) UFCmL^{-1} .

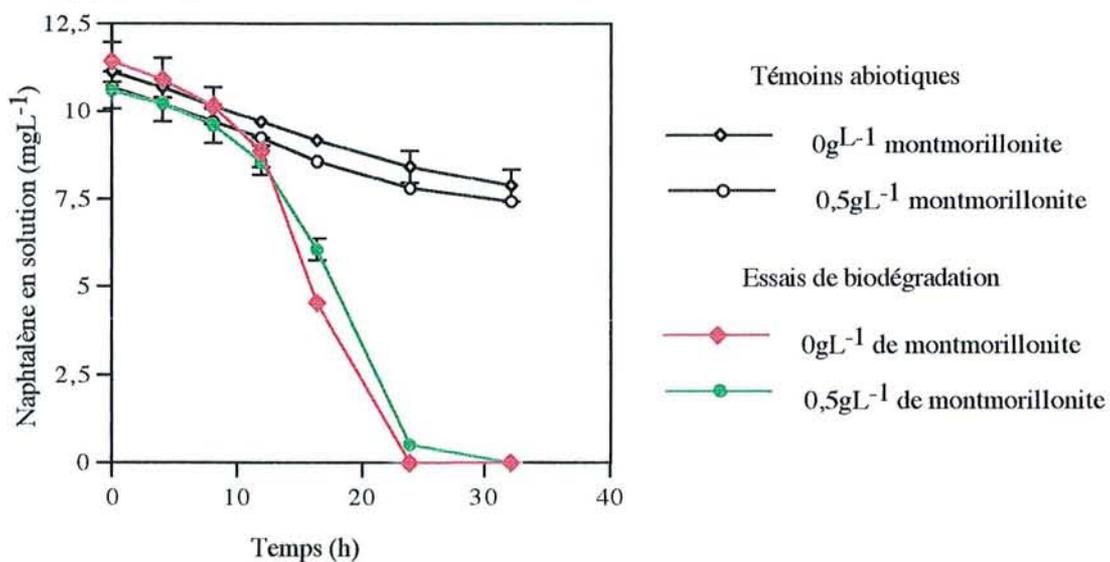


Figure 5.5. Evolution de la concentration en naphthalène avec 0gL^{-1} et $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite sous agitation (500rpm) à 30°C pour les témoins abiotiques et en présence de 10^7UFCmL^{-1} ($n=2$)

Nous avons vu précédemment que la montmorillonite de sodium est un support minéral qui n'adsorbe pas le naphthalène (§4.3). Or la présence de particules de montmorillonite limite la

biodégradation et crée certainement une gêne à la dégradation. Pour confirmer cette observation, une expérience de dégradation du naphthalène a été réalisée en présence de plusieurs concentrations de montmorillonite. La figure 5.6 montre l'évolution de la concentration en naphthalène sans déduction de la volatilisation.

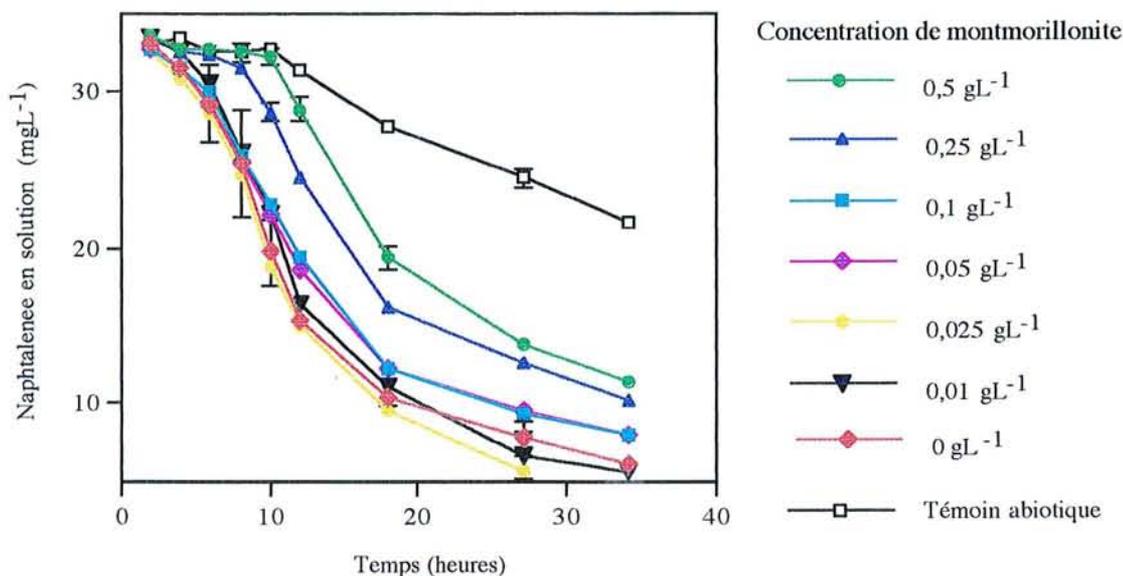


Figure 5.6. Evolution de la concentration en naphthalène en présence de différentes concentrations en montmorillonite et de $1,8 \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ (*Burkholderia cepacia*) sous agitation (500rpm) à 30°C (n=2)

Les courbes de dégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations en montmorillonite de sodium sont dans cet essai très distinctes : plus la concentration particulaire en montmorillonite de sodium augmente, plus le temps nécessaire pour biodégrader une même quantité de naphthalène est long. Ceci se traduit par l'apparition d'une phase de latence pour les concentrations de 0,25 et de 0,5gL⁻¹ d'argile, une diminution des vitesses maximales de dégradation et des constantes cinétiques déterminées selon la méthode de calcul précisée au paragraphe 3.11.5 (Tableau 5.2). Les courbes montrent une biodégradation inachevée en 35 heures. En effet, parce que la biodégradation n'est pas achevée, une concentration résiduelle en naphthalène de 6mgL⁻¹ est observée pour 0gL⁻¹ de montmorillonite et une concentration de 11,3mgL⁻¹ pour 0,5gL⁻¹ de montmorillonite.

Aucune croissance bactérienne mesurée par bactéries cultivables sur milieu gélosé (§3.1.3) n'a été observée. $1,8 (0,26) \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ ont été introduites à $t = 0$, et à $t = 34$ heures, un même nombre de microorganismes a été estimé ($1,9 (0,17) \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$).

Tableau 5.2. Paramètres cinétiques de biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de montmorillonite de sodium

Montmorillonite (mgL ⁻¹)	Phase de latence (h)	Vmax (mgL ⁻¹ h ⁻¹)	k (h ⁻¹)
0	2 (0)	3,27 (0,98)	0,054 (0,002)
0,01	2 (0)	2,43 (0,05)	0,055 (0,005)
0,025*	2 (0)	3,03 (-)	0,055 (-)
0,05	2 (0)	1,77 (0,21)	0,046 (0,002)
0,1	4 (0,1)	2,14 (0,53)	0,043 (0,002)
0,25	8 (0)	1,39 (0,08)	0,029 (0,002)
0,5	10 (0)	1,03 (0,09)	0,022 (0,002)

* La concentration à 0,025gL⁻¹ de montmorillonite n'a été testée qu'en simplicat
 Les nombres entre parenthèses représentent les écarts-types (n=2)
 Les valeurs sont calculées, la volatilisation ayant été prise en compte

5.3.3. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe montmorillonite/polyacrylamide

La biodégradation du naphthalène a été testée en présence de différentes concentrations de complexe montmorillonite/polyacrylamide. Les courbes non corrigées des pertes par volatilisation sur les témoins abiotiques sont présentées en figure 5.7 et les valeurs brutes en annexe 15.

Une faible croissance bactérienne (significative au seuil de probabilité de 0,05) a été constatée au cours des 10 heures d'expérience. La population bactérienne est passée de 9,4 (1,3) 10⁶ UFCmL⁻¹ à 13,4 (2,07) 10⁶ UFCmL⁻¹.

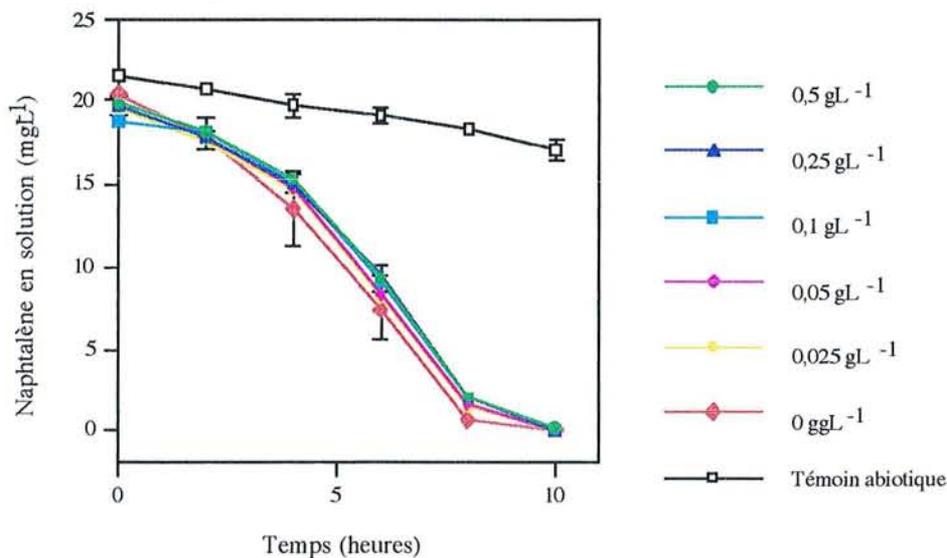


Figure 5.7. Evolution de la concentration en naphthalène en présence de différentes concentrations en complexe montmorillonite/polyacrylamide pour une concentration initiale en *Burkholderia cepacia* de 9,4 10⁶ UFCmL⁻¹ (Agitation à 500rpm à une température de 30°C) - Témoin abiotique pour 0gL⁻¹ de complexe

L'allure des courbes est similaire à celle observée pour la biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite. En effet, l'augmentation de la concentration en complexe contribue à augmenter le temps nécessaire à la dégradation de l'hydrocarbure, mais les différences sont moins spectaculaires que pour la montmorillonite (§5.3.2). Les paramètres cinétiques vitesse maximale de dégradation et constante cinétique du premier ordre sont présentés dans le Tableau 5.3.

Tableau 5.3. Effet de la concentration en complexe sur les paramètres cinétiques de biodégradation du naphthalène

Complexe (gL^{-1})	k (h^{-1})	Vmax ($\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$)
0	0,308 (0,031)	3,31 (0,92)
0,025	0,278 (0,006)	3,24 (0,11)
0,05	0,271 (0,002)	3,24 (0,07)
0,1	0,208 (0,001)	3,40 (0,32)
0,25	0,257 (0,001)	3,53 (0,33)
0,5	0,264 (0,003)	3,61 (0,05)

Les valeurs sont calculées volatilisation prise en compte
Les nombres entre parenthèses représentent les écarts-types (n=2)

Les différences entre les valeurs des constantes cinétiques du premier ordre k ne sont pas significativement différentes lorsque les valeurs consécutives sont comparées. Il est possible d'expliquer ces faibles modifications de vitesses ou de constantes de deux façons : la concentration de $0,5\text{gL}^{-1}$ de complexe représente environ le même et faible nombre de particules apportées dans l'essai de biodégradation du naphthalène en présence de $0,25\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite (§5.3.2). Or, la modification des vitesses de biodégradation n'était visible avec la montmorillonite que pour des concentrations supérieures à $0,1\text{gL}^{-1}$. De plus, des tests de relargage du polyacrylamide dans le milieu minéral n'ont montré aucune présence du polymère dans le milieu. Il n'y a donc probablement aucun échange en polymère et cations.

Il a été vérifié que l'ajout de matière organique sous forme de polyacrylamide dissous et non biodégradable (Osswald, 1991) ne modifiait en rien le comportement des microorganismes vis-à-vis du naphthalène. La comparaison des cinétiques de biodégradation du naphthalène en absence et en présence de $0,12\text{gL}^{-1}$ de polymères (quantité présente dans $0,5\text{gL}^{-1}$ de complexe) est présentée en figure 5.8.

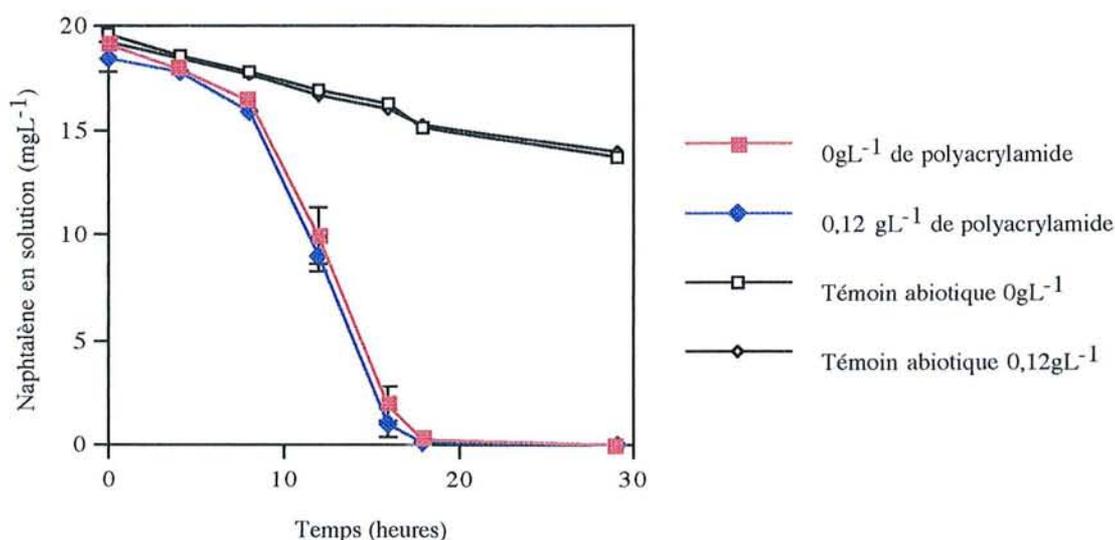


Figure 5.8. Evolution du naphthalène avec et sans polyacrylamide (PM 44000) en présence de $4,5 \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *Burkholderia cepacia* à 30°C avec une agitation à 500rpm ($n=2$)

Un doublement de la population bactérienne a été constaté au cours de la biodégradation du naphthalène. Le nombre de bactéries (*Burkholderia cepacia*) se multipliant sur gélose nutritive (§3.1.1) est passé de $4,5 (0,70) 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ à $11,0 (1,7) 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$.

La présence de polyacrylamide de masse moléculaire 44000, dissous et non biodégradable ne modifie en rien les cinétiques de biodégradation. En effet, les courbes se superposent et les vitesses maximales de dégradation sont identiques ($1,84 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Toutes ces expériences confirment que la modification des cinétiques de biodégradation est directement liée à la présence de matériau sous forme particulaire (montmorillonite, complexe organo-argileux) et non de matériau sous forme dissoute.

5.3.4. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34

Après avoir testé des matériaux de faible rétention (complexe) ou sans capacité d'adsorption du naphthalène (montmorillonite de sodium), une expérience de biodégradation du naphthalène a été réalisée en présence d'argile organique B34, adsorbant de grande capacité. Les concentrations testées sont comprises entre 0 et 1 g L^{-1} . Pour chaque concentration en B34, une quantité différente de naphthalène se trouve sous forme adsorbée : de 0% à 90 % (§4.2.3) pour une concentration initiale en naphthalène de $9,3 \text{ mg L}^{-1}$.

Les courbes sont présentées sans prise en compte de la disparition abiotique due à la volatilisation (en moyenne 25% en fin de cette expérience). Toutes les valeurs brutes de biodégradation (concentration en naphthalène et biomasse bactérienne) en présence d'argile organique B34 sont présentées en annexe 16.

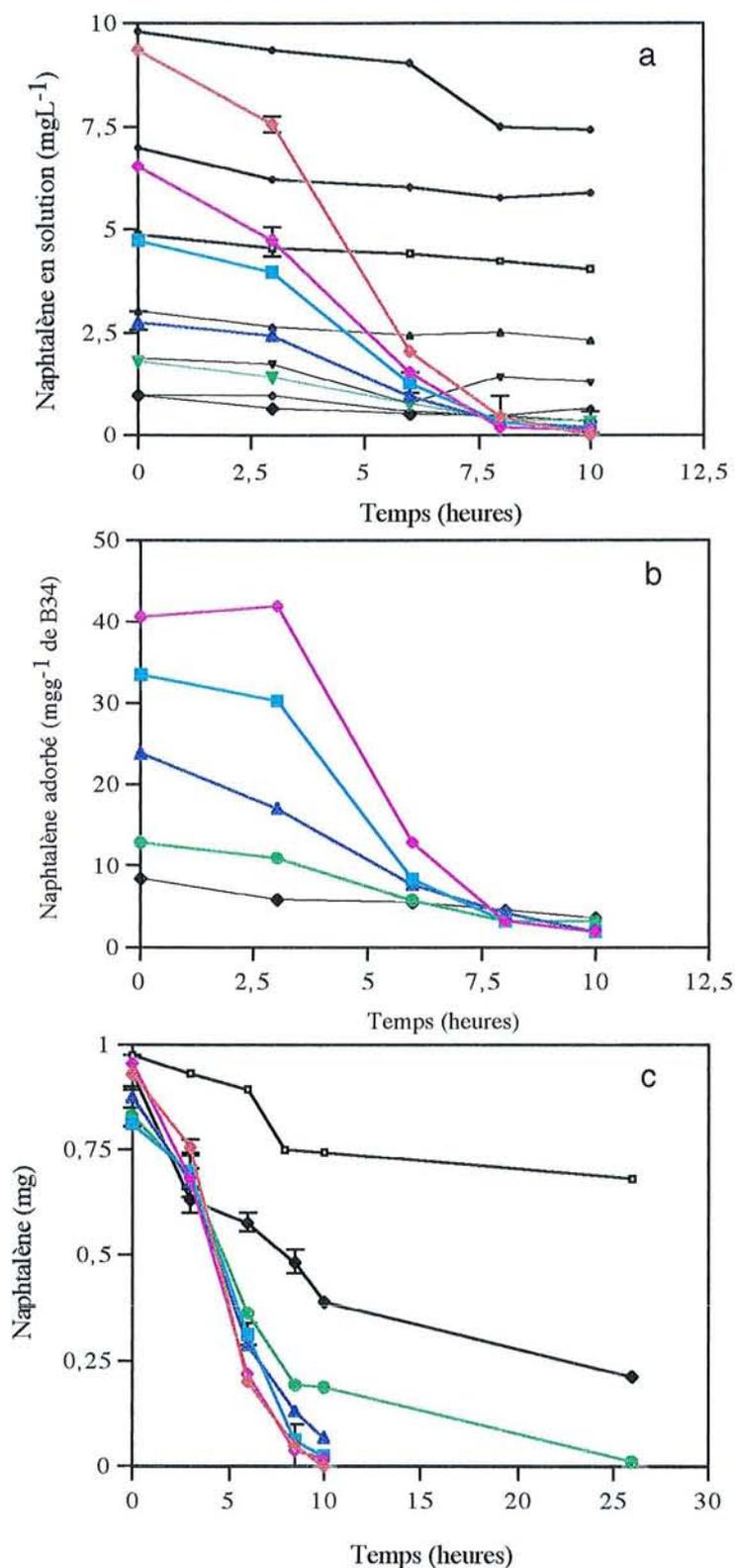


Figure 5.9. Evolution du naphthalène dans une suspension d'argile organique B34 et de *Burkholderia cepacia* a) Naphthalène en solution, b) Naphthalène adsorbé et c) Naphthalène total (solution+adsorbé) 0gL⁻¹ de B34 (—●—), 0,05gL⁻¹ (—◆—), 0,1gL⁻¹ (—■—), 0,25gL⁻¹ (—▲—), 0,5gL⁻¹ (—●—) et 1gL⁻¹ (—◆—) - Témoins abiotiques (noir) pour chaque concentration - Ci=9,3mg naphthalène L⁻¹ et 1,5.10⁶UFCmL⁻¹ (Agitation à 500rpm à 30°C)

A $t = 0$, $1,5 \cdot 10^6$ bactéries viables mL^{-1} (UFC) sont introduites dans chaque flacon essai. Une faible croissance bactérienne de $3 \cdot 10^6$ est observée pendant les 10 heures de l'essai de biodégradation.

La figure 5.9 a) montre la disparition due à la biodégradation du naphthalène restant en solution après l'équilibre entre la phase liquide et la phase solide. La disparition du naphthalène en fonction du temps correspond à une dégradation (la volatilisation mesurée sur les témoins concerne moins de 25% du produit) et a permis une croissance des microorganismes (production de $3 \cdot 10^6$ UFC mL^{-1}). En 10 heures tout le naphthalène en solution est consommé (Figure 5.9 a).

L'évolution du naphthalène adsorbé, mesuré après désorption dans une solution de méthanol (§3.7), montre une diminution de la fraction adsorbée au cours du temps (Figure 5.9 b). Cette diminution correspond à une dégradation biologique par *Burkholderia cepacia*, mais il n'est malheureusement pas possible de déterminer si le naphthalène est tout d'abord désorbé avant d'être consommé. Cependant, sachant que la sorption du naphthalène sur l'argile organique B34 est un processus réversible et rapide (équilibre d'adsorption et de désorption atteint en environ 2 heures), une désorption s'opère consécutivement à la diminution de la concentration du substrat en solution par biodégradation.

L'erreur sur la mesure du naphthalène désorbé (obtenu après désorption) est élevée mais reste dans tous les cas inférieure à 20%. Cette erreur contient l'erreur sur la mesure du naphthalène par HPLC et l'erreur due à l'extraction dans le méthanol.

L'évolution de la quantité totale de naphthalène (adsorbé + solution) est représentée en figure 5.10 c). Les courbes ont été tracées en sommant la quantité de naphthalène en solution et celle sorbée par l'argile organique. Le naphthalène est exprimé en masse (mg) pour un volume total de milieu de 100mL.

A $t = 0$, la différence de 0,15mg (soit 17%) pour chaque quantité de B34 est due d'une part aux erreurs de mesure liées à la désorption du naphthalène (<20%) et à la dilution du milieu lors de l'ajout de l'inoculum (environ de 5%).

A $t = 10\text{h}$, la quantité totale de naphthalène restant est nulle ou presque pour une concentration en B34 inférieure ou égale à $0,1\text{gL}^{-1}$. Pour les concentrations supérieures, la biodégradation n'est pas encore terminée. Il faut attendre par exemple 26h pour $0,5\text{gL}^{-1}$ de B34 et à $t = 26\text{h}$, il reste encore 25% de produit adsorbé pour 1gL^{-1} de B34.

Les vitesses de disparition du naphthalène ont été calculées pour chaque entité, *i.e.* le naphthalène en solution et le naphthalène sorbé sur l'argile (Tableau 5.4).

Tableau 5.4. Vitesses maximales de disparition du naphthalène (mg h^{-1}) pour des concentrations initiales en solutions différents ($q_i = 0,93$ mg de naphthalène total)

B34 (g L^{-1})	Naphtalène en solution (mg)	Vmax Solution	Vmax Adsorbé
0	0,93 (0,01)	0,170 (0,007)	-
0,05	0,65 (0,02)	0,104 (0,002)	0,049 (0,003)
0,1	0,47 (0,01)	0,085 (0,045)	0,073 (0,023)
0,25	0,27 (0,02)	0,046 (0,050)	0,078 (0,021)
0,5	0,17 (0,01)	0,021 (0,002)	0,074 (0,011)
1	0,09 (0,01)	0,006 (0,003)	0,036 (0,007)

Les nombres entre parenthèse sont les écarts-types ($n=2$)

Les valeurs ont été déterminées volatilisatoin prise en compte

Les vitesses de disparition du naphthalène en solution diminuent quand la quantité d'argile organique B34 augmente et quand le naphthalène en solution diminue (Tableau 5.4). Les vitesses de disparition du naphthalène adsorbé sont quant à elles semblables quelle que soit la quantité adsorbée (Tableau 5.4). Il est alors logique de penser qu'elles sont tributaires de la vitesse de désorption indépendante de la concentration (chapitre 4).

Les vitesses maximales de dégradation du naphthalène total ainsi que les constantes cinétiques du premier ordre sont réduites proportionnellement à la quantité d'adsorbant présent (Tableau 5.5).

Tableau 5.5. Vitesses maximales de dégradation du naphthalène et constantes cinétiques de biodégradation du premier ordre pour la totalité du naphthalène présent dans l'essai

B34 (g L^{-1})	Contante du 1 ^o ordre k (h^{-1})	Vitesses maximale de dégradation
0	0,158	0,170 (0,007)
0,05	0,182	0,154 (0,030)
0,1	0,155	0,129 (0,058)
0,25	0,114	0,128 (0,048)
0,5	0,073	0,109 (0,013)
1	0,034	0,021 (0,025)

Les chiffres entre parenthèse correspondent aux écarts-types

L'expérience suivante a été réalisée afin de vérifier si la différence de la concentration initiale en solution S_0 pour un même inoculum X_0 a une influence sur les cinétiques de biodégradation du naphthalène et si les valeurs de cinétiques pour des concentrations initiales pouvaient être directement comparées.

L'expérience est réalisée en triplicat avec (1) une concentration en B34 de 0g L^{-1} et une concentration en naphthalène de $14,2\text{mg L}^{-1}$, (2) une concentration en B34 de $0,1\text{g L}^{-1}$ (environ 50%

du naphthalène est adsorbé) (Concentration initiale en solution = $7,1\text{mgL}^{-1}$) et (3) 0gL^{-1} de B34, mais une concentration initiale en naphthalène proche de la concentration en solution obtenue avec $0,1\text{ gL}^{-1}$ de B34 ($8,4\text{mgL}^{-1}$).

$1,5 \cdot 10^6\text{ UFCmL}^{-1}$ sont introduites dans chaque flacon essai. Une croissance de $4 \cdot 10^6\text{ UFCmL}^{-1}$ a été observée pendant les 12 heures de la cinétique de biodégradation.

La figure 5.10 montre l'évolution du naphthalène en solution et l'évolution du naphthalène adsorbé correspondant aux trois situations ci-dessus.

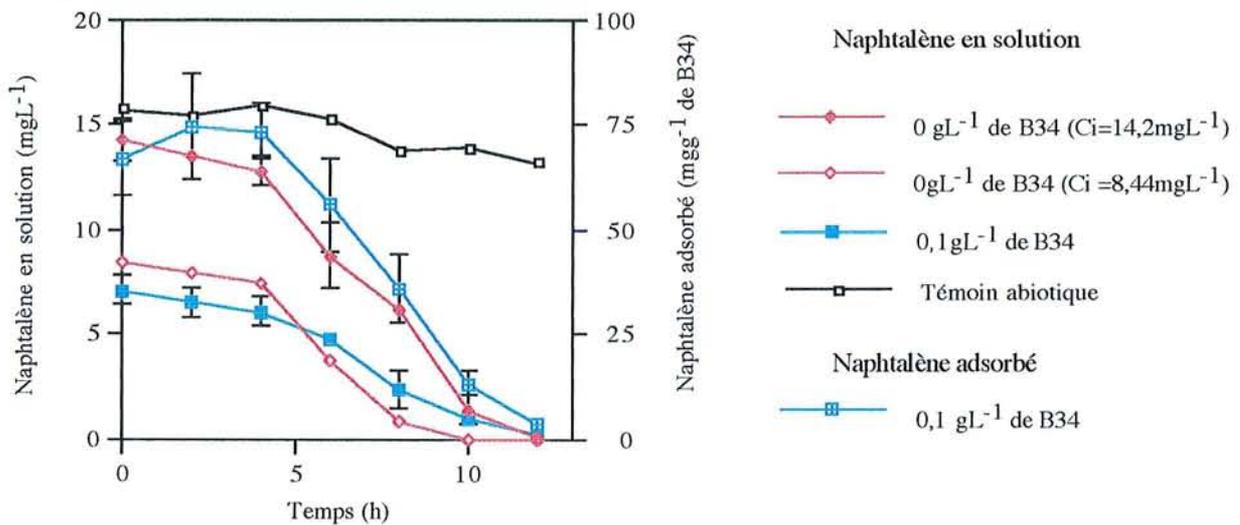


Figure 5.10. Evolution de la concentration en naphthalène avec ($0,1\text{gL}^{-1}$) et sans argile organique B34 en présence de *Burkholderia cepacia* ($1,5 \cdot 10^6\text{ UFCmL}^{-1}$) à 30°C sous agitation magnétique (500rpm)

Les deux courbes de consommation du naphthalène sans argile présentent la même allure, même si les concentrations initiales en substrat sont différentes. La biodégradation du naphthalène est maximale entre 4h et à $t=10\text{ h}$, tout le naphthalène en solution est consommé. Il faut cependant attendre 12h pour une consommation complète de $14,2\text{mgL}^{-1}$ de naphthalène.

Si on considère tout d'abord la dégradation du naphthalène en solution ($C_i=7,1\text{mgL}^{-1}$ en présence de $0,1\text{gL}^{-1}$ d'argile organique B34 et $C_i=8,4\text{mgL}^{-1}$ de naphthalène pour 0gL^{-1} de B34 initialement présents dans les essais), les deux courbes de dégradation se croisent. La cinétique en présence de B34 est plus lente (Tableaux 5.6). Il faut également noter que la somme des vitesses maximales du naphthalène en solution et du naphthalène adsorbé ($0,126+0,113=0,239\text{mgh}^{-1}$) correspond à la vitesse maximale calculée sur le naphthalène en solution sans particules solides ($0,234\text{mgh}^{-1}$).

Tableau 5.6. Vitesses maximales de disparition du naphthalène V_{max} exprimées en masse d'hydrocarbure dans l'essai par unité de temps

Conditions de l'essai	Concentrations dans l'essai	V_{max} (mg h^{-1})
Solution sans B34	$C_i = 14,2 \text{ mgL}^{-1}$	0,234 (0,036)
Avec $0,1 \text{ gL}^{-1}$ B34	Adsorbé Solution ($C_i = 7,1 \text{ mgL}^{-1}$)	0,126 (0,030)
		0,113 (0,020)

La différence entre la vitesse maximale de dégradation du naphthalène avec et sans B34, même si elle est faible, est significative pour 2 concentrations initiales de 7,1 et 8,4 mgL^{-1} . De plus, les vitesses sont fonction de la concentration initiale en substrat. Ceci nous incite à la prudence quant à la comparaison de valeurs pour des expériences différentes dont les conditions initiales diffèrent par la concentration de substrat et de microorganismes dégradeurs.

La figure 5.11 monte l'évolution de la concentration en naphthalène total (adsorbé + solution) en présence et en l'absence de B34 pour une même concentration initiale en naphthalène (14,2 mgL^{-1}) et le tableau 5.7 fournit les vitesses maximales de dégradation du naphthalène total avec et sans argile organique B34.

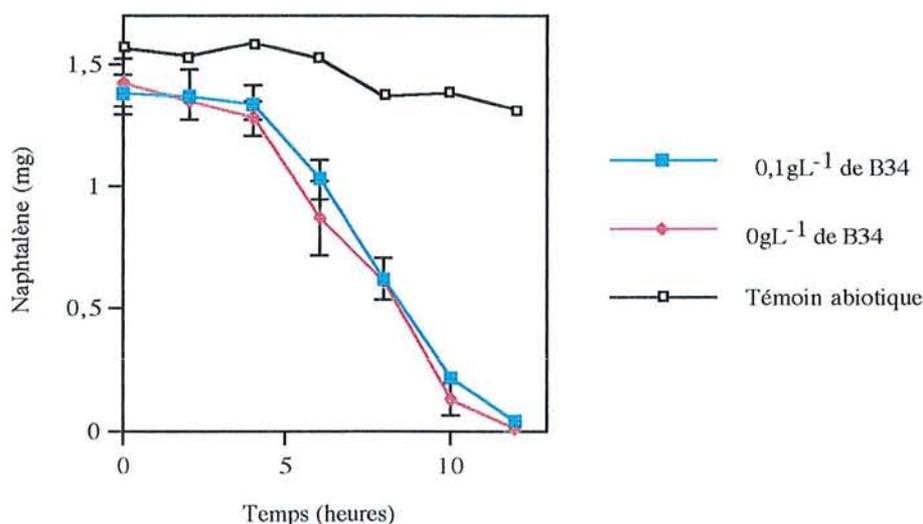


Figure 5.11. Evolution de la concentration totale en naphthalène (adsorbé + solution)

Tableau 5.7. Vitesses maximales de disparition du naphthalène total - Comparaison avec et sans B34

B34 (g L^{-1})	Vitesses (mg h^{-1})
0	0,234 (0,036)
0,1*	0,186 (0,001)

* Calculée sur la courbe de biodégradation du naphthalène total (adsorbé + solution)

En présence de 0,1g L^{-1} de B34, environ la moitié du naphthalène se trouve sous forme adsorbée et la vitesse globale maximale est diminuée de 21%. Cette diminution du même ordre de grandeur (24%) a été constatée pour l'expérience en présence de plusieurs concentrations d'argile organique (Figure 5.9) et démontre une excellente répétition des expérimentations.

5.3.5. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment de rivière

L'étude des cinétiques de biodégradation du naphthalène dans des suspensions a été également réalisée en présence d'un matériau naturel, un sédiment de rivière (§5.3.5). Les concentrations testées de 0 à 50g L^{-1} sont plus importantes que celles employées avec les supports argileux. Le sédiment étant un matériau possédant une faible capacité adsorbante pour le naphthalène comparé à l'argile organique B34 (Chapitre 4), il a fallu travailler avec des concentrations s'échelonnant jusqu'à 50g L^{-1} de sédiment pour obtenir une rétention du naphthalène de 50% environ, contrairement à l'argile organique B34 dont seulement une concentration de 0,1g L^{-1} suffit à adsorber la moitié du naphthalène présent en solution. Les courbes de disparition du naphthalène sont présentées en figure 5.12. Chaque point est une moyenne de deux valeurs et les valeurs brutes sont annexées (Annexe 18).

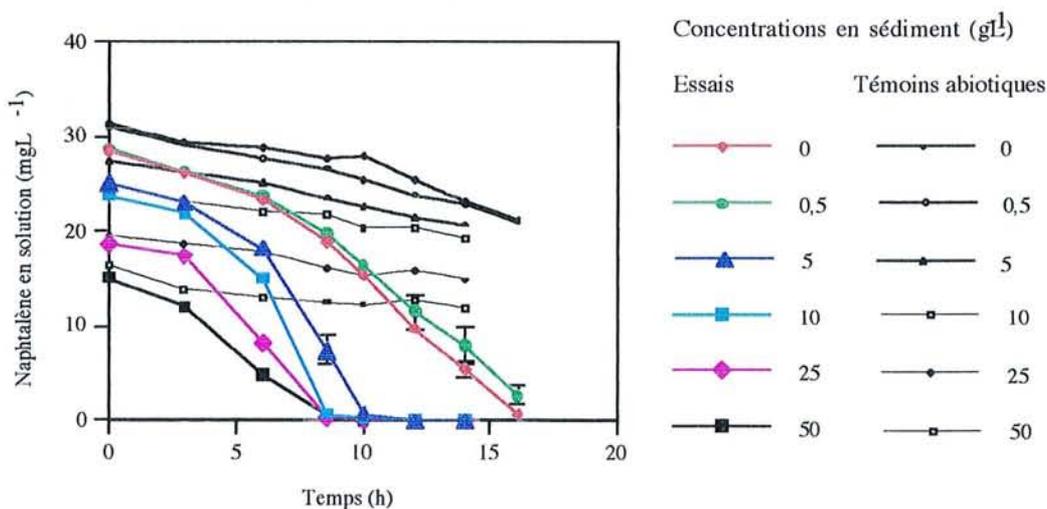


Figure 5.12. Evolution de la concentration de naphthalène en solution en présence de différentes concentrations de sédiment de rivière non stérile - Agitation à 500rpm à 30°C - Ajout de 10⁶UFCmL⁻¹ de *Burkholderia cepacia*

Il n'a pas été possible de doser le naphthalène adsorbé sur le sédiment (par désorption) comme il avait été pratiqué avec l'argile organique B34. En effet, le sédiment provenant d'une rivière ayant subi des pollutions organiques, placé dans une solution de méthanol donne un surnageant après centrifugation de couleur brunâtre qui même dilué ne permet pas de reconnaître le pic du naphthalène (bruit de fond trop important). Les données de biodégradation en présence de sédiments sont donc réduites à l'évolution du naphthalène en solution.

Le sédiment naturel ajouté dans chaque essai de biodégradation n'a subi aucune stérilisation. Il apporte donc des microorganismes (environ 10^4 microorganismes par gramme de sédiment, cultivés sur milieu solide gélosé contenant du naphthalène (§3.1)). Ces microorganismes sont apparemment incapables d'attaquer le naphthalène sur 27 heures car les concentrations de naphthalène mesurées (à $t=27h$) en présence de $1gL^{-1}$ de sédiment non stérile et avec $40mgL^{-1}$ d' $HgCl_2$ sont identiques.

Le tableau 5.8 présente les vitesses maximales et spécifiques de dégradation du naphthalène ainsi que les constantes cinétiques du premier ordre. Les concentrations initiales introduites variant de $0,45.10^6UFcmL^{-1}$ à $0,86.10^6UF/mL^{-1}$, les vitesses ont été rapportées au nombre de bactéries de façon à s'assurer que la différence observée dans les vitesses mesurées n'est pas liée à l'inoculum.

Tableau 5.8. Paramètres cinétiques de biodégradation du naphthalène en présence de différentes concentrations de sédiment

Sédiment (gL^{-1})	Vitesses ($mgL^{-1}h^{-1}$)	Vitesses spécifiques ($mgL^{-1}h^{-1}10^{-6}\phi$)	Constante k (h^{-1})
0	2,85 (0,09)	3,43 (0,10)	0,08 (0,01)
0,5	2,94 (0,22)	2,88 (0,21)	0,06 (0,02)
5	4,62 (0,56)	5,43 (0,65)	0,29 (0,06)
10	5,38 (0,43)	5,27 (0,41)	0,48 (0,10)
25	3,21 (0,05)	2,01 (0,03)	0,21 (0,14)
50	2,38 (0,13)	1,95 (0,11)	0,48 (0,15)

La population de *Burkholderia cepacia* reste stable tout au long de l'essai de biodégradation montrant qu'il n'y a pas croissance des microorganismes. Cependant, pour les concentrations en sédiment les plus importantes (25 et $50gL^{-1}$), il devient impossible de dissocier de façon certaine *Burkholderia cepacia* et les microorganismes indigènes, formant parfois des mycéliums et interdisant tout comptage.

Les résultats de biodégradation obtenus sont assez surprenants. Globalement, l'ajout de sédiment permet une augmentation des vitesses de biodégradation jusqu'à une concentration de $10gL^{-1}$ de sédiment et ensuite, les vitesses "diminuent".

L'interprétation des résultats de biodégradation du naphthalène en présence de sédiments est délicate par manque de données sur l'évolution de la quantité de naphthalène adsorbé (impossibilité de pratiquer une désorption sur le sédiment contaminé) de par la présence de certains composés ou organismes.

Tout d'abord, le sédiment apporte environ 3mg de carbone organique dissous par gramme de sédiment (§3.4 et Annexe 6). Difficilement oxydable par voie chimique (persulfate de sodium et UV) et il est probable qu'il soit aussi difficilement oxydable par voie biologique. Néanmoins, le COD relargué peut constituer une seconde source de carbone pour *Burkholderia cepacia* en sus du naphthalène.

Dans un second temps, la présence effective de métaux dans le sédiment peut conférer un caractère toxique au sédiment. Cependant, la forme des métaux combinée ou complexée avec des oxydes ou de la matière organique leur conférerait un comportement non actif.

Le troisième point concerne l'apport de microorganismes autochtones par le sédiment non stérilisé. Bien que les expériences réalisées avec 1gL^{-1} de sédiment soit environ 10^4 microorganismes par gramme de sédiment (UFC) montrent une non dégradation du naphthalène en 27 heures, il est possible que l'apport de quantités plus importantes de sédiment et de microorganismes, participent à l'attaque du naphthalène. Nous notons d'ailleurs une augmentation de la population bactérienne autochtone de $0,1 \cdot 10^6$ à $0,3 \cdot 10^6$ et de $0,3 \cdot 10^6$ à $0,5 \cdot 10^6$ au cours de la dégradation du naphthalène pour les concentrations en sédiment de 25 et 50gL^{-1} respectivement (Annexe 18).

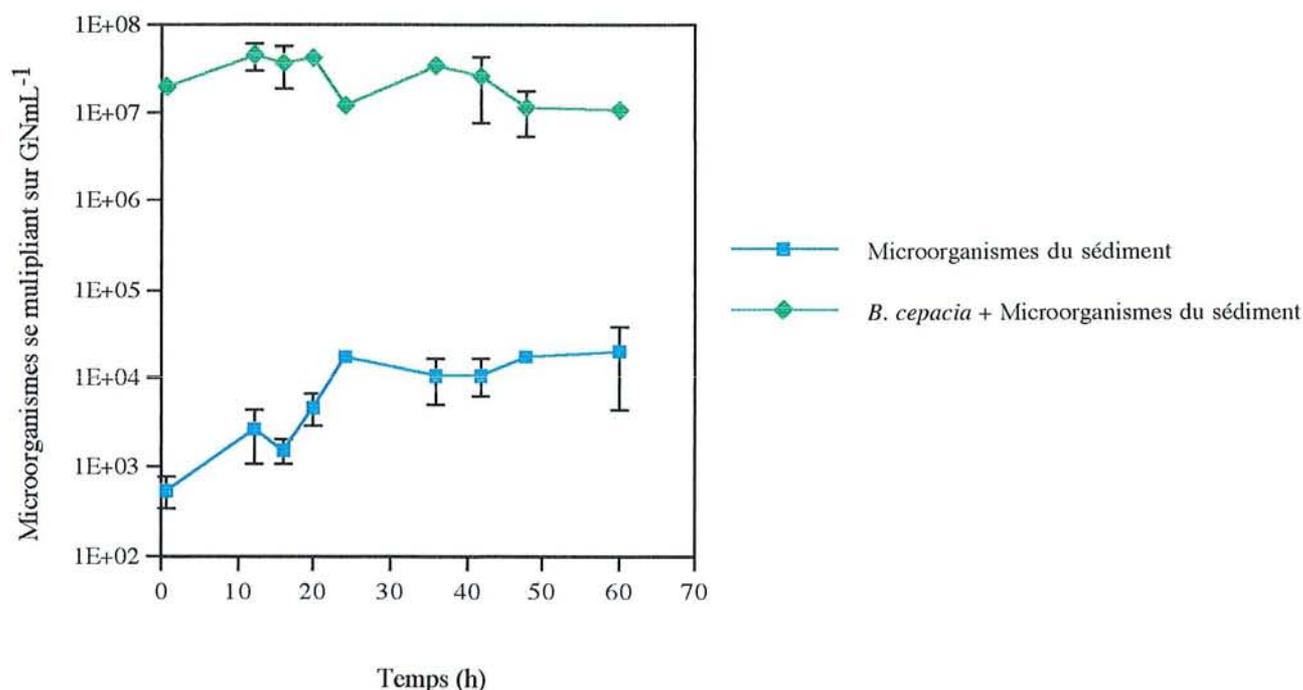


Figure 5.13. Evolution de la concentration en microorganismes (*Burkholderia cepacia* et microorganismes autochtones) dans une suspension de 1gL^{-1} de sédiment sans ajout de naphthalène

Sur la base de ces constatations, les hypothèses soulevées pour expliquer une augmentation de la biodégradation du naphthalène jusqu'à des concentrations de 10gL^{-1} de sédiment est une croissance bactérienne en présence du sédiment (Figure 5.13). Le sédiment apporterait donc une part de carbone biodégradable. La diminution des vitesses de biodégradation est liée à l'adsorption du naphthalène sur le sédiment rendant cette fraction de substrat non disponible aux microorganismes. Cette hypothèse est supportée par le fait que les constantes cinétiques de dégradation du premier ordre du naphthalène dans la phase liquide ne sont pas statistiquement différentes pour les concentrations en sédiment de 10, 25 et 50gL^{-1} .

5.4. Discussion

Le naphthalène, hydrocarbure polyaromatique, est un composé organique dégradé par des microorganismes, et plus particulièrement les bactéries du genre *Aeromonas* (Kiyohara et Nagao, 1978) et *Pseudomonas* (*putida*, *fluorescens*, ...) (Barnsley, 1976; Bateman *et al.*, 1986; Cerniglia, 1993; Guerin et Boyd, 1992;). *Burkholderia cepacia* (ex *Pseudomonas*) (Liste de validation n°45, 1993) est capable de dégrader cet hydrocarbure. Bien que le naphthalène en solution disparaisse complètement dans les essais de biodégradation, nous n'avons pas cherché à savoir si la biodégradation par *Burkholderia cepacia* était ultime (*i.e.* le carbone apporté par le naphthalène est transformé en biomasse et dioxyde de carbone). Aucune recherche des métabolites produits n'a été entreprise d'un part parce que ce n'était pas du tout l'objectif de cette étude et d'autre part, parce que la littérature décrit cet hydrocarbure comme facilement dégradé et non persistant dans l'environnement (Howard, 1989).

Les résultats de biodégradation montrent que les cinétiques sont dépendantes du rapport S_0/X_0 , rapport entre la concentration initiale en substrat et la concentration initiale en microorganismes (Chudobba *et al.*, 1991; Thouand *et al.*, 1995; Simkins et Alexander, 1984). Pour comparer nos résultats, nous avons essayé de travailler avec un inoculum dense de façon à limiter et négliger la croissance bactérienne. Les modèles cinétiques appliqués sont le modèle du premier ordre sans croissance ou encore le modèle linéaire pour calculer des vitesses maximales d'assimilation du naphthalène par les bactéries. Ces modèles appliqués ne s'ajustent pas forcément très bien aux valeurs expérimentales. En fonction des conditions initiales, une linéarisation est parfois meilleure qu'une cinétique de forme exponentielle, ce qui rejoint le travail de Simkins et Alexander (1984) sur le fait que les cinétiques sont dépendantes des concentrations initiales. C'est pourquoi, nous avons appliqué ces deux modèles à toutes nos cinétiques.

La présence de particules minérales et organo-minérales modifie les cinétiques de biodégradation plus généralement contribue à les ralentir. Par contre, elles ne sont pas influencées par la présence de matière dissoute et non biodégradable : une même vitesse et une même quantité de naphthalène consommée par les microorganismes ont été mesurées en présence de $0,12\text{gL}^{-1}$ de polyacrylamide.

La limitation de la biodégradation du naphthalène a été constatée en présence des systèmes contenant montmorillonite et argile organique B34. De nombreuses études montrent des constatations semblables avec des particules de sol (Guerin et Boyd, 1992; Mihelcic et Luthy, 1991; Ogram *et al.*, 1985; Rijnaarts *et al.*, 1990), d'argile (Subba Rao et Alexander, 1982; Weber et Coble, 1968; Wzolek et Alexander, 1979) ou même des particules synthétiques telles que des billes de Téflon (Harms et Zehnder, 1994; 1995). Guerin et Boyd (1992) ont mesuré des constantes cinétiques de dégradation du premier ordre du naphthalène par *Pseudomonas putida* décroissantes en fonction de la quantité de sol présent en suspension. La constante équivaut à $2,58\text{h}^{-1}$ sans sol, ne vaut plus que $0,96\text{h}^{-1}$ pour 66gL^{-1} de sol et diminue encore à $0,48\text{h}^{-1}$ pour 200gL^{-1} du même sol.

La comparaison des rapports des constantes de dégradation avec et sans particules est présentée Figure 5.14.

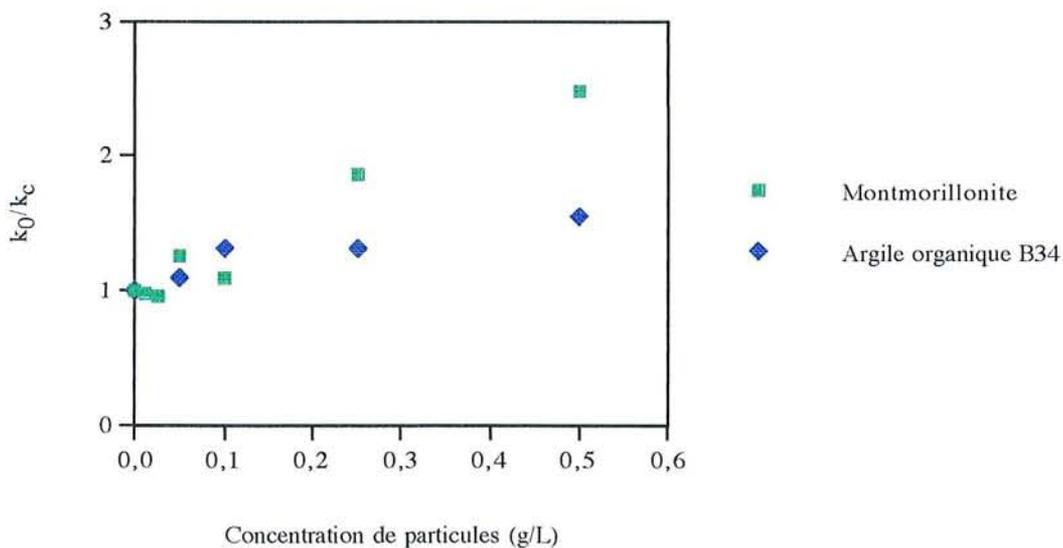


Figure 5.14. Evolution des rapports des constantes k (sans particules k_0 et avec différentes concentrations k_c) en fonction de la concentration en montmorillonite et B34

La figure 5.14 montre que le rapport augmente lorsque la quantité de particules en suspension s'accroît. Par exemple, il existe un rapport de 2,16 entre k déterminé sans B34 et avec $0,5\text{g}^{-1}\text{L}$ et un rapport 2,48 pour les mêmes concentrations de montmorillonite. Dans un même ordre d'idée, Guerin et Boyd (1992) ont constaté une diminution de la biodisponibilité du naphthalène en présence de sol. La variation dans les constantes de dégradation modélisées selon un premier ordre, est beaucoup plus faible : il existe un rapport compris entre 2 et 5 pour des

concentrations plus forte variant entre 0 et 200g⁻¹L de sol (2 sols différents testés) tandis que nous avons des variations du même ordre pour des concentrations particulières beaucoup plus faibles (<1gL⁻¹).

Les cinétiques de biodégradation avec le complexe ne donnant pas de résultats différents pour les concentrations testées de 0 à 0,5g de complexe L⁻¹ peuvent être interprétées de la façon suivante : les concentrations employées sont trop faibles pour donner des résultats différents car comparativement à la montmorillonite, 0,5gL⁻¹ de complexe fournit la même quantité de particules que 0,25gL⁻¹ de montmorillonite. La différence entre les cinétiques n'apparaissant qu'à partir de 0,1gL⁻¹, les concentrations de complexe testées sont alors trop faibles pour avoir un effet significatif. De surcroît, le complexe ne piège pas de cations initialement présents dans le milieu minéral : les éléments minéraux ne sont pas en concentration limitante.

Dans le cas de Guerin et Boyd (1992), la limitation de la biodisponibilité est expliquée par les auteurs par une rétention du polluant par le sol. Cet argument ne peut pas s'appliquer à l'argile organique B34 puisque la comparaison des cinétiques de biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique avec les cinétiques de désorption (Tableau 5.8) montrent que pour toutes les concentrations testées, les vitesses de désorption sont au moins 10 fois plus grandes que les constantes de biodégradation. De plus, nous avons montré dans le chapitre 4 que les constantes de désorption n'étaient pas fonction de la quantité adsorbée. Ces résultats démontrent comme ceux de Rijnaarts *et al.* (1990) et ceux de Mihelcic et Luthy (1991) que la cinétique de désorption n'est pas le facteur limitant de la biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34.

Tableau 5.8. Constantes du premier ordre de désorption et de biodégradation du naphthalène en présence de B34

B34 (gL ⁻¹)	k désorption (h ⁻¹)	k biodégradation (h ⁻¹)
0	-	0,158
0,05	1,90	0,182
0,1	1,44	0,155
0,25	2,21	0,114
0,5	1,71	0,073
1	1,95	0,034

Rijnaarts *et al.* (1990) de même que Mihelcic et Luthy (1991) incriminent la diffusion intraparticulaire ou interne, *i.e.* à l'intérieur des pores des particules de sol, d'être responsable de la limitation de la biodisponibilité de l' α -hexchlorocyclohexane et du phénanthrène respectivement. La diffusion du polluant dans les pores dans lesquelles il est retenu est plus lente que la diffusion dans la phase aqueuse. Cette hypothèse peut être soulevée pour l'argile organique B34 et sera développé dans le chapitre 6. Par contre, elle ne peut s'appliquer à la montmorillonite de sodium

qui n'adsorbe pas le naphthalène.

L'interprétation des résultats de consommation du naphthalène en présence de sédiment est délicate, parce que le sédiment apporte d'une part une seconde source de carbone (3mgCOD/g de sédiment) et d'autre part environ 10^4 microorganismes par gramme de sédiment. L'augmentation de la biodégradation peut alors être attribuée à un apport extérieur de microorganismes et à un apport extérieur de carbone. Des résultats similaires de stimulation de la biodégradation avaient été constatés par Shimp et Young (1988) et Kunc et Stotsky (1977). Mihelcic et Luthy (1991) ont aussi constaté une augmentation des taux de biodégradation du phénanthrène de $0,35\text{mgL}^{-1}\cdot\text{jour}$ pour 2gL^{-1} de sol à $0,83\text{mgL}^{-1}\cdot\text{jour}$ pour $5,3\text{g}$ de sol. Ces auteurs ont en effet expliqué la stimulation de la biodégradation d'un aldéhyde par un apport de microorganismes en même temps que l'ajout de montmorillonite non stérile dans leurs essais de biodégradation (Shimp et Young, 1988 et Kunc et Stotsky, 1977) et avec le sol pour Mihelcic and Luthy (1991).

Bien qu'il soit difficile d'expliquer la diminution des cinétiques pour de faibles concentrations de sédiment, certaines hypothèses peuvent être émises : présence de métaux qui peuvent être toxiques (Manilal et Alexander, 1991; Stevens *et al.*, 1990), disponibilité réduite des éléments nutritifs ou réduction de la diffusivité externe ou interne (Rijnaarts *et al.*, 1990).

5.5. Conclusion

Après avoir étudié le comportement physico-chimique du naphthalène dans différents milieux contenant des particules en suspension, son comportement a été étudié face à la dégradation par une espèce bactérienne *Burkholderia cepacia*.

La limitation de la biodégradation du naphthalène dans une suspension de montmorillonite de sodium peut s'expliquer de deux façons qui seront développées dans le chapitre 6 1) une limitation d'ordre biologique, *i.e.* -un manque d'éléments minéraux (cations) facilement échangeables avec le sodium de la montmorillonite et 2) une barrière à la diffusion du substrat vers *Burkholderia cepacia* (limitation du transfert de masse externe) la montmorillonite, constituée d'un assemblage de feuillets de petite taille ($0,5\mu\text{m}$ en moyenne) s'agrégeant avec les microorganismes.

Les résultats montrant des cinétiques proches avec ou sans complexe s'expliquent par des concentrations en particules testées trop faibles et par un milieu minéral non limitant contrairement à celui contenant la montmorillonite.

L'interprétation des données mesurées avec le sédiment naturel est délicate. Le sédiment constitue une source secondaire de carbone et de microorganismes. De plus, il contient des métaux qui peuvent être toxiques.

Quant aux expériences réalisées avec l'argile organique B34, adsorbant du naphthalène, elles montrent une diminution des cinétiques de biodégradation et donc de la biodisponibilité du naphthalène. Comme la désorption n'est pas le facteur limitant la biodégradation (les cinétiques sont environ 10 fois plus grandes), l'hypothèse d'une limitation du transfert du naphthalène peut être émise.

Ces hypothèses font l'objet d'expériences décrites dans le chapitre 6.

5.6. Références Bibliographiques

AL-BASHIR B., T. CSEH, R. LEDUC and R. SAMSON, 1990,
Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions,
Appl. Microbiol. Biotechnol., **34**, 414-419.

BATEMAN J.N., B. SPEERS, L. FEDUIK and R.A. HARTLINE, 1986,
Naphthalene association and uptake in *Pseudomonas putida*,
J. Bacteriol., **166**, 155-161.

BARNESLEY E.A., 1976,
Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol metabolism in *Pseudomonads* metabolizing naphthalene and salicylate,
J. Bacteriol., **125**, 404-408.

BERTHELIN J., C. LEYVAL et F. TOUTAIN, 1994,
Biologie des sols - Rôle des organismes dans l'altération et l'humification,
in Pédologie, 2, Constituants et propriétés du sol, 2^o Edition, M. Bonneau et B. Souchier (eds), Masson, 143-237.

BOUWER E.J., 1992,
Bioremediation of organic contaminants in the subsurface,
Environ. Microbiol., 287-318.

BUITRON G. and B. CAPDEVILLE, 1993,
Uptake rate and mineralization of hexadecane and naphthalene by a mixed aerobic culture,
Wat. Res., **27**, 847-853.

CERNIGLIA C.E., 1993,
Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons,
Current Option in Biotechnology, **4**, 331-338.

CHOTTE J.L., L. JOCTEUR MONROZIER, G. VILLEMIN et F., TOUTAIN , 1992,
Effet du mode de dispersion du sol sur la localisation de sa biomasse microbienne, cas d'un vertisol,
Cah. Orstom, sér. Pédol., **1**, 81-95.

CHUDOBA P., J. CHANG and B. CAPDEVILLE, 1991,
Synchronized division of activated sludge microorganisms,
Wat. Res., **25**, 817-822.

DUNN N.W. and I.C. GUNSALUS, 1973,
Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*,
J. Bacteriol., **114**, 974-949.

GUERIN W.F. and S.A. BOYD, 1992,
Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species,
Appl. Environ. Microbiol., **58**, 1142-1152.

GOTTSCHALK G. (ed), 1986,
Bacterial Metabolism, second edition, Springer-Verlag, New York, 359 pages.

HARMS H. and A.J.B. ZEHNDER, 1994,
Influence of substrate diffusion on degradation of dibenzofuran and 3-chlorodibenzofuran by attached and suspended bacteria,
Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2736-2745.

- HARMS H. and A.J.B. ZEHNDER, 1995,
Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran,
Applied Environ. Microbiol., 61, 27-33.
- HOWARD P.H. (ed), 1989,
Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals,
Lewis Publishers, Chelsea, 574 pages.
- HOWARD P.H., R.S. BOETHLING, W.F. JARVIS, W.M. MEYLAN and E.M. MICHALENKO, 1991,
Handbook of Environmental Degradation Rates,
Lewis Publishers, Chelsea, 725 pages.
- KUNC F. and G. STOTZKY, 1986,
Acceleration of aldehyde decomposition in soil by montmorillonite,
Soil Science, 124, 167-172.
- List No.45, 1993,
Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB,
Inter. J. Systematic Bacteriol., 43, 398-399.
- MANITAL V. B. and M. ALEXANDER, 1991,
Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 401-405.
- MIGNOT L. and G.A. JUNTER, 1990,
Diffusion in immobilized-cell agar layers : influence of microbial burden and cell morphology on the diffusion coefficients of L-malic acid and glucose,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 418-423.
- MIHELICIC J.R. and R.G. LUTHY, 1991,
Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions,
Environ. Sci. Technol., 25, 169-177.
- OGRAM A.V., R.E. JESSUP, L.T. OU and P.S.C. RAO, 1985,
Effects of sorption on biological degradation rates of (2,4-dichlorophenoxy)acetic acid in soils,
Appl. Environ. Microbiol., 49, 582-587.
- OSSWALD P., 1991,
Etude de la dégradation par une biomasse fixée d'un xénobiotique peu soluble : l'atrazine,
Rapport de DEA, 30 pages.
- PELMONT J. (ed), 1993,
Enzymes,
Collection Grenoble Sciences, Grenoble, 597 pages.
- RAMASWAMI A. and R.G. LUTHY, 1992,
Modeling the dissolution and biodegradation of PAH compounds from hydrocarbon at residual saturation in microporous media,
Progress Report to Texaco Inc., Research and Development, Beacon, New York, 1-23.
- RIJNAARTS H.H.M., A. BACHMANN, J.C. JUMELET and A.J.B. ZEHNDER 1990,
Effect of desorption and intraparticle mass transfert on the aerobic biomineralization of α -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil,
Environ. Sci. Technol., 24, 1349-1354.

- SHIMP R.J. and R.L. YOUNG, 1988,
Availability of organic chemicals for biodegradation in settle bottom sediments,
Ecotox. Environ. Safety, **15**, 31-45
- SIMKINS S. AND M. ALEXANDER, 1984,
Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and
population density,
Appl. Environ. Microbiol., **47**, 1299-1306.
- SMITH M.R., 1994,
The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria,
in *Biochemistry of Microbial Degradation*, C. Ratledge (ed), Kluwer Academic Publishers,
London, 347-378.
- STEVENS T.O., R.L. CRAWFORD and D.L. CRAWFORD, 1990,
Biodegradation of dinoseb (2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol) in several Idaho soils with various
dinoseb exposure histories,
Appl. Environ. Microbiol., **56**, 133-139.
- SUBBA RAO R.V. and M. ALEXANDER, 1982,
Effect of sorption on mineralization of low concentrations of aromatic compounds in lake
water samples,
Appl. Environ. Microbiol., **44**, 659-668.
- THOUAND G., P. FRIAND, F. BOIS, A. CARTIER, A. MAUL and J.C. BLOCK, 1995,
Bacterial inoculum density and probability of para-nitrophenol biodegradability test response,
Ecotox. Environ. Safety, **30**, 274-282.
- WEBER J.B. and H.D. COBLE, 1968,
Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays,
J. Agri. Food Chem., **16**, 475-478.
- WISE M.G., L.J. SHIMKETS and J. VAUN McARTHUR, 1995,
Genetic structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*,
Appl. Environ. Microbiol., **61**, 1791-1798.
- WSZOLEK P.C. and M. ALEXANDER, 1979,
Effect of desorption on the biodegradation of *n*-alkylamines bound to clay,
J. Agri. Food Chem., **27**, 410-414.
- YABUUCHI E., Y. KOSAKO, H. OYAIZU, I. YANO, H. HOTTA, Y. HASHIMOTO, T.
EZAKI and M. ARAKAWA, 1992,
Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas*
homology Group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni
and Holmes 1981) comb.nov.,
Microbiol. Immunol., **36**, 1251-1275.

CHAPITRE 6

PARAMETRES CONTRÔLANT LA BIODIPONIBILITE DU NAPHTALENE

Chapitre 6. Paramètres contrôlant la biodisponibilité du naphthalène.....	131
6.1. Introduction	131
6.2. Protocole expérimental.....	133
6.2.1. Biodégradation du naphthalène avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite sous différentes vitesses d'agitation.....	133
6.2.2. Diffusion du naphthalène à travers une membrane : Influence de la présence de montmorillonite	133
6.2.3. Biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et dans un milieu échangé par du sodium	134
6.3. Résultats.....	134
6.3.1. Transfert de masse externe.....	134
6.3.1.1. Distribution, granulométrie des suspensions argileuses et observations microscopiques	134
6.3.1.2. Biodégradation du naphthalène avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite à différentes vitesses d'agitation.....	139
6.3.1.3. Diffusion du naphthalène à travers une membrane : Influence de la présence de montmorillonite	141
6.3.1.4. Diffusion dans la couche limite	142
6.3.2. Transfert de masse interne du naphthalène dans l'argile organique B34... ..	144
6.3.3. Biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et le milieu échangé ("surnageant de montmorillonite")	145
6.4. Discussion.....	148
6.5. Conclusion	150

Chapitre 6. Paramètres contrôlant la biodisponibilité du naphthalène

6.1. Introduction

Dans les expériences décrites au chapitre 5 “Biodégradation du naphthalène en présence de suspensions argileuses”, la biodégradation du naphthalène apparaît limitée de façon significative en présence de montmorillonite de sodium et d’argile organique B34. L’objectif de ce chapitre 6 est de déterminer et de comprendre quels sont les mécanismes responsables de la limitation de la biodisponibilité du naphthalène.

Plusieurs hypothèses, par ailleurs rencontrées dans la littérature (Chapitre 2, analyse bibliographique) ont été émises : i) la sorption du polluant rendant le composé adsorbé inaccessible et sa désorption lente qui limite la biodégradation, ii) le transfert de masse externe, iii) le transfert de masse interne, iv) la capacité des particules solides à “piéger” tout élément, organique ou inorganique et même les exoenzymes sécrétées par les microorganismes dégradeurs v) ou encore l’apport d’éléments toxiques en même temps que les particules solides.

i) La sorption (adsorption et absorption) d’un composé est un des mécanismes souvent incriminé dans la limitation des cinétiques de biodégradation. Pour de nombreux auteurs, un composé organique adsorbé ne peut être assimilé par les microorganismes bactériens : il doit se trouver sous forme dissoute. Parmi de nombreuses études, Weber et Coble (1968) ont été dans les premiers à constater qu’une adsorption diminuait les cinétiques de biodégradation : une adsorption de 50% de diquat sur la montmorillonite diminue de 50% la quantité de CO₂ produit.

ii) Le transfert de masse externe, c’est-à-dire la diffusion du composé dans la couche limite à l’extérieur des particules peut aussi limiter la biodisponibilité. Cependant, dans des systèmes soumis à une agitation (la plupart des expériences de laboratoire), la couche limite est réduite et le transfert de masse externe devient alors négligeable ou non limitant (Brusseau *et al.*, 1991; Mihelcic et Luthy, 1991; Rijnaarts *et al.*, 1990; Wu et Gschwend, 1986).

Dans les systèmes non turbulents, Stapleton *et al.* (1994) ont montré que le transfert de masse externe pouvait jouer un rôle, même dans des systèmes contenant de faibles concentrations en particules. Ces auteurs ont mesuré que le transfert de masse externe limitait l’adsorption d’un polluant hydrophobe, le pyrène, lorsque les concentrations en solide (sédiment de lac) étaient inférieures à 6,7gL⁻¹. Par contre, pour des concentrations plus importantes, de l’ordre de 250gL⁻¹, la diffusion intraparticulaire, encore appelée transfert de masse interne (dans les pores des particules solides) devenait le principal facteur limitant.

iii) Le transfert de masse interne du polluant adsorbé dans les pores est un mécanisme souvent mis en cause pour expliquer la limitation de la biodisponibilité en présence de particules microporeuses. En effet, la diffusion du composé à l’intérieur des pores (incluant sorption et transport) est souvent plus faible que dans la phase aqueuse (Mihelcic et Luthy, 1991; Rijnaarts *et al.*, 1990; Scow et Alexander, 1992; Zhang *et al.*, 1995).

iv) Enfin, la présence de particules solides peut induire une modification de l'environnement bactérien assez important pour modifier la biodégradation par piégeage d'enzymes excrétées par les microorganismes (Burns, 1980; Quiquampoix *et al.*, 1993), enzymes dont l'activité catabolique est décrie par leur adsorption (Quiquampoix, 1987 a,b; Staunton et Quiquampoix, 1994) ou encore d'éléments nutritifs minéraux (Manilal et Alexander, 1991).

v) Un apport d'éléments toxiques peut être responsable d'une diminution de biodisponibilité.

Parmi ces hypothèses, la sorption comme terme limitant a été écarté de nos hypothèses puisque la montmorillonite ne retient pas l'hydrocarbure ($K_p=0\text{gL}^{-1}$). De plus, les chapitres 4 et 5 ont montré que la cinétique de désorption du naphthalène à partir de l'argile organique B34 (adsorbant de grande capacité pour le naphthalène ($K_p=\text{gL}^{-1}$) étant supérieure aux cinétiques de biodégradation ne pouvaient être le facteur limitant. Comme la dégradation du naphthalène étant un mécanisme apparemment intracellulaire (Smith, 1994), l'hypothèse de sorption d'exoenzymes n'est pas envisageable. Les hypothèses de limitation de transfert de masse et de piégeage des éléments nutritifs inorganiques ont donc été retenues et vérifiées au long de ce chapitre.

Ce chapitre s'organise en trois parties. La première partie s'applique à la vérification de l'hypothèse de la limitation de la biodisponibilité du naphthalène par limitation du transfert de masse externe avec les particules de montmorillonite et d'argile organique B34. Pour ce faire, deux expériences ont été mises en oeuvre : une expérience de biodégradation du naphthalène par *Burkholderia cepacia* en présence de montmorillonite sodique sous différentes vitesses d'agitation, une expérience de mesure de diffusion du naphthalène à travers une membrane en présence et absence de montmorillonite. Par ailleurs, un calcul de l'épaisseur de la couche limite autour des particules de montmorillonite et d'argile organique B34 ainsi qu'un appui visuel grâce à des photographies prise en microscopie électronique à transmission ont permis de conforter les résultats des expériences.

La seconde partie concerne le transfert de masse interne car les particules d'argile organique B34 peuvent être considérées comme des particules microporeuses dans lesquelles pénètre le naphthalène. Bien que certainement négligeable à cause de vitesses de désorption très rapides, la diffusivité du naphthalène dans les pores a été estimée.

Enfin, l'hypothèse de rétention d'éléments nutritifs minéraux a été vérifiée par dosage des cations présents dans le milieu minéral (§6.3.3) avant et après échange avec la montmorillonite sodique et l'argile organique B34. La biodégradation du naphthalène a été par ailleurs testée dans le milieu minéral et dans le milieu ayant été en contact avec la montmorillonite possédant une forte capacité d'échange cationique.

6.2. Protocole expérimental

6.2.1. Biodégradation du naphthalène avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite sous différentes vitesses d'agitation

Cet essai de biodégradation du naphthalène a pour but de déterminer l'influence du transfert de masse externe du naphthalène sur les cinétiques de biodégradation. En effet, l'influence de l'agitation de la suspension de montmorillonite sur la biodégradation du naphthalène renseigne sur l'importance du transfert de masse externe.

Les témoins abiotiques contenant $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite de sodium (soniquée pendant 3 minutes dans un bain) sont réalisés en duplicat dans des flacons en Téflon de 250mL (Nalgène) contenant 100mL de solution stérile à base de naphthalène (§3.3). Les essais de biodégradation du naphthalène en présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite dans une solution de naphthalène (§3.3) sont réalisés en triplicat. Au temps $t=0$, $1,8 \cdot 10^6$ bactéries cultivables mL^{-1} (*Burkholderia cepacia*) sont introduites dans chaque flacon essai. Tous les flacons sont placés sur un agitateur multipostes (Bioblock) et sont agités à l'aide de barreaux magnétiques recouverts de Téflon de 25mm. Les vitesses d'agitation employées sont : 0rpm, 250rpm et 500rpm. Les flacons non agités (0rpm) sont néanmoins soumis à une agitation de 20 secondes maximum avant chaque prélèvement. Les échantillons prélevés à des temps différents sont centrifugés pendant 10 minutes à 45000g dans des tubes Téflon. Le naphthalène en solution dans le surnageant est dosé par HPLC (§3.6).

6.2.2. Diffusion du naphthalène à travers une membrane : Influence de la présence de montmorillonite

Cette expérience réalisée dans des conditions abiotiques a pour but de déterminer si la présence de montmorillonite en suspension à une concentration de $0,5\text{gL}^{-1}$ modifie la diffusivité du naphthalène dans la phase aqueuse.

Le principe employé est emprunté à Mignot et Junter (1990). La diffusion du naphthalène à travers une membrane de filtration est mesurée dans un système contenant un milieu minéral. La mesure de la diffusivité à travers la membrane est ensuite comparée à la mesure obtenue avec le naphthalène dissous dans une suspension de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite.

Le montage employé est celui décrit au paragraphe 3.12. La chambre 1 est remplie exactement 1012mL de solution stérile à base de naphthalène (§3.3) ou de suspension à $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite et la chambre 2 avec le même volume de milieu minéral (§3.2). Les solutions et l'appareillage sont placés à une température de 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). Toutes les heures environ, 1mL de milieu est prélevé à travers un septum Téflon à l'aide d'une seringue en verre. Le prélèvement est effectué dans chaque chambre de mesure de façon à préserver un même volume dans chaque

Chambre. Le naphthalène en solution est dosé par HPLC (§3.6).

Chaque expérience est renouvelée 2 fois.

6.2.3. Biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et dans un milieu échangé par du sodium

Cet essai est réalisé dans un but de montrer l'influence d'un milieu minéral limitant sur la dégradation du naphthalène.

Une suspension de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite de sodium (§3.4.1) est préparée dans le milieu minéral (§3.2). Après forte agitation par barreau magnétique pendant 2 heures, la suspension est centrifugée à 45000g pendant 15 minutes et le surnageant est récupéré. Deux milieux à base de naphthalène sont alors préparés : l'un dans le surnageant de montmorillonite et l'autre dans le milieu minéral (§3.2). 100mL de ces milieux stérilisés par autoclavage sont répartis dans des flacons Téflon de 250mL (Osi). Pour chaque milieu, trois flacons sont inoculés avec $2,5 \cdot 10^7 \text{UFCmL}^{-1}$ de *Burkholderia cepacia* et trois autres ne recevant pas d'inoculum servent de témoin.

A différents temps t , 10mL de suspension bactérienne sont prélevés dans chaque flacon, centrifugés à 45000g pendant 10 minutes et la concentration du naphthalène dans le surnageant est dosée par HPLC (§3.6). A ces mêmes temps t , la quantité de bactéries est évaluée par étalement sur milieu gélosé (§3.1.3) après dilutions successives dans du sérum physiologique.

6.3. Résultats

6.3.1. Transfert de masse externe

6.3.1.1. Distribution, granulométrie des suspensions argileuses et observations microscopiques

Des mesures de taille de particules ont été réalisées sur toutes les suspensions de montmorillonite, complexe, argile organique, sédiment et les mélanges avec les microorganismes par diffraction laser. Les courbes des systèmes montmorillonite et B34 sont présentées respectivement en figure 6.1 et 6.2 et en annexe 18 pour le complexe et le sédiment.

La taille des particules de montmorillonite mesurée par diffraction laser augmente en présence des bactéries. Ainsi, comme le montre la figure 6.1, le diamètre volumique moyen (mesuré au maximum d'intensité du pic) de la montmorillonite ($0,5\mu\text{m}$) augmente à $2,2\mu\text{m}$ en présence de *Burkholderia cepacia* dont le diamètre moyen est de $1,1\mu\text{m}$. Un second groupe de

particules de diamètre moyen $15\mu\text{m}$ apparaît. Ce second groupe est de poids beaucoup moins important que des particules de $2,2\mu\text{m}$, car il représente un nombre de particules négligeable par rapport au nombre de particules de tailles de $2,2\mu\text{m}$. Ces résultats conduisent à conclure à une agrégation entre les microorganismes et les particules d'argile deux fois plus petites a lieu.

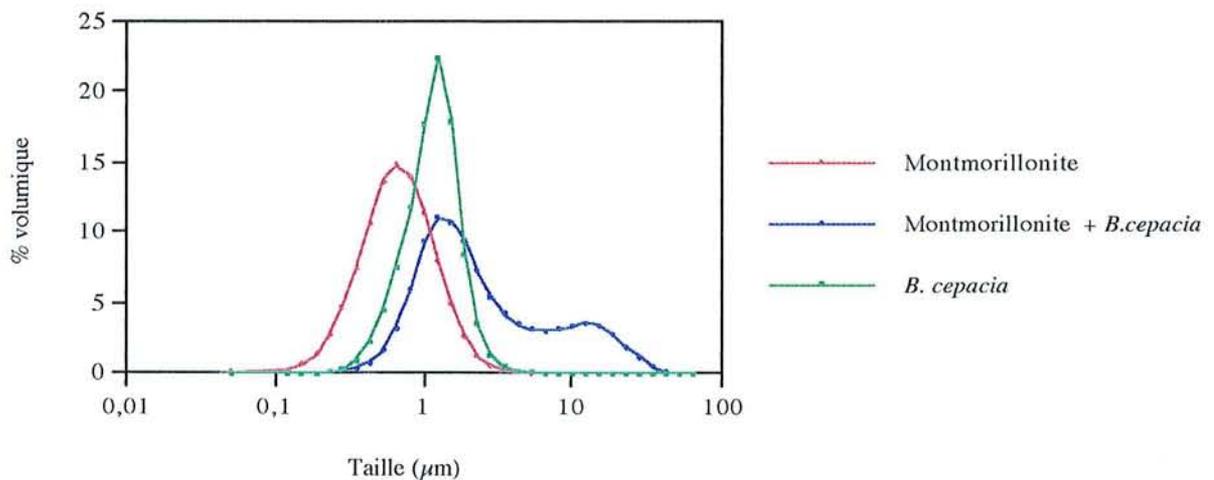


Figure 6.1. Taille des particules de montmorillonite, de montmorillonite avec *Burkholderia cepacia* et des bactéries mesurée en diffraction laser

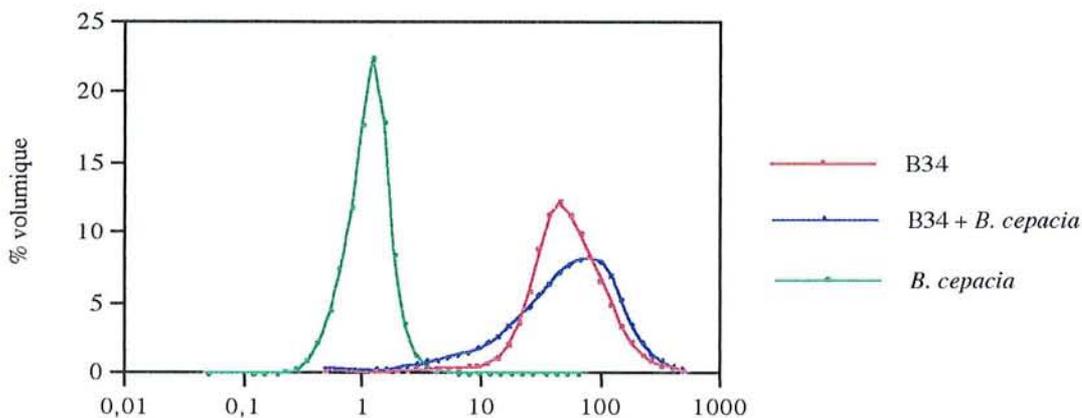


Figure 6.2. Taille des particules d'argile organique B34, de B34 en présence de *Burkholderia cepacia* et de *Burkholderia cepacia* mesurée en diffraction laser

Avec les particules d'argile organique B34, la taille des particules de B34 n'est que très faiblement modifiée en présence des microorganismes (Figure 6.2). Le diamètre volumique moyen des particules d'argile organique vaut $55\mu\text{m}$ contre $60\mu\text{m}$ avec *Burkholderia cepacia*.

Des constatations similaires ont été observées avec le complexe montmorillonite / polyacrylamide et le sédiment de rivière dont les tailles moyennes des particules sont données dans le tableau 6.1.

Tableau 6.1. Diamètres volumiques moyens pour chaque système (μm)

Bc	M	M+Bc	C	C+Bc	B34	B34+Bc	Sed	Sed+Bc
1,1	0,5	2,2	1,5	2,5	55	60	25	48

Bc : *Burkholderia cepacia*, M : montmorillonite, C : complexe, B34 : argile organique B34, Sed : Sediment

Pour connaître l'agencement des particules de montmorillonite par rapport aux microorganismes, des photos ont été prises en microscopie électronique à balayage et en transmission.

Une suspension de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite, de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite contenant $9 \cdot 10^9$ bactéries L^{-1} bactéries est déposée et séchée sur un filtre pour une observation au microscope à balayage (MEB) (§3.10.1). Les images de surface de la montmorillonite et de la montmorillonite + bactéries sont identiques (Figure 6.3). Le même aspect de relief de l'image de surface donnée par le mélange montmorillonite et bactéries laisse suggérer que les microorganismes sont totalement recouverts des feuillets d'argile. La réalisation d'un spectre électronique de surface (§3.10.1) confirme que la nature de la surface est la même que les microorganismes soient présents ou non : seule la montmorillonite est visualisée (Spectres en annexe 19).

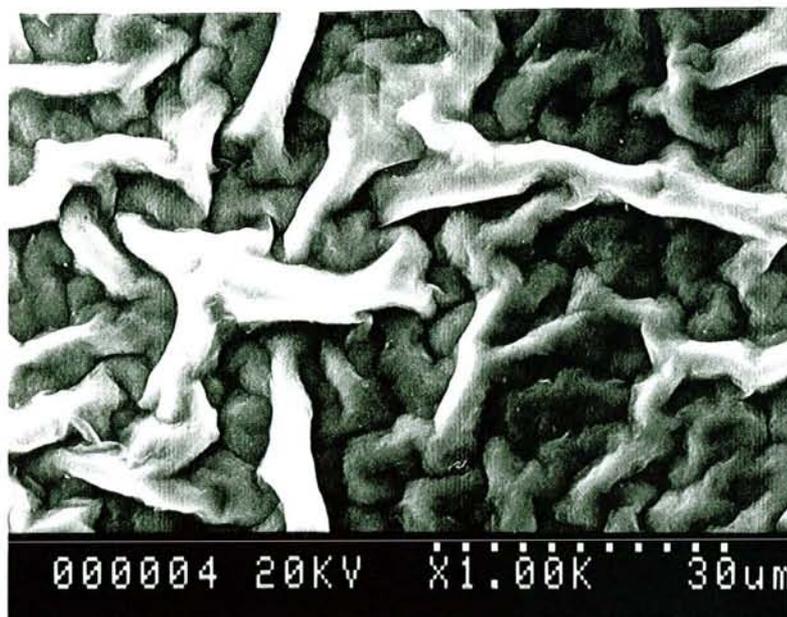


Figure 6.3. Montmorillonite + *Burkholderia cepacia* observées en microscopie électronique à balayage (l'espace entre les 10 points vaut $30\mu\text{m}$)

L'organisation des microorganismes en présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite est observé en microscopie électronique en transmission (MET) après réalisation de coupes (§3.10.2). L'observation des coupes de bactéries, montmorillonite et montmorillonite + bactéries a été réalisée après une coloration de contraste au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle (§3.10.3.1). Les photos en figure 6.4 montrent successivement une bactérie de *Burkholderia cepacia* (a), des feuillets de montmorillonite (b) et une bactérie en présence de feuillets (c).

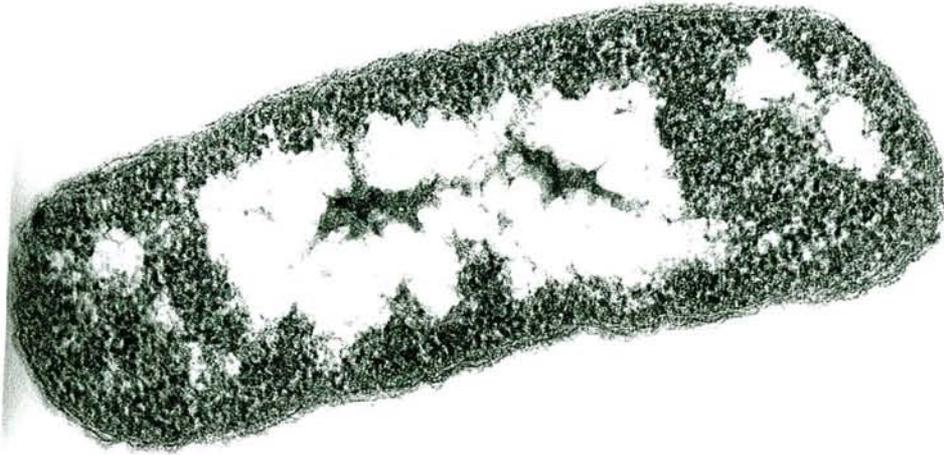


Figure 6.4. a) *Burkholderia cepacia* (x 35000)



Figure 6.4. b) Feuillet de montmorillonite (x 75000)

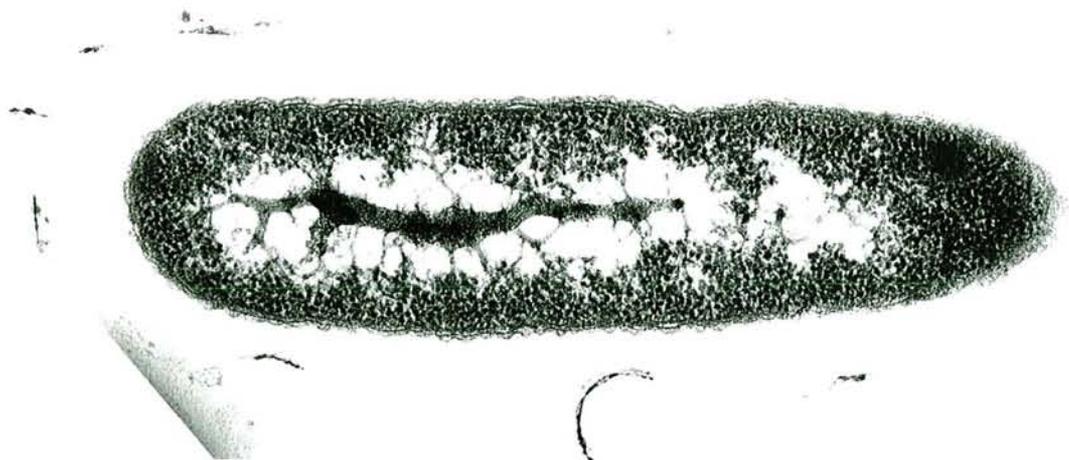


Figure 6.4. c) *Burkholderia cepacia* en présence de feuillet de montmorillonite (x 28000)

Il est très nettement visible sur la photo (a) que la bactérie présente une forme allongée (*Burkholderia cepacia* sont des bactéries Gram négatif en forme de bâtonnets) et sa double paroi caractéristique des Gram négatifs est très bien visualisée.

Les feuillets de montmorillonite (photo b) sont ici sous forme de tactoïde, c'est-à-dire qu'ils forment une association de plusieurs feuillets.

La figure (c) est très intéressante parce qu'elle montre une bactérie en présence de feuillets de montmorillonite. Les feuillets sont placés autour de la membrane bactérienne sans pour autant la recouvrir complètement ni la toucher.

Cette dernière photographie confirme l'augmentation de la taille des particules visualisées en diffraction laser par agrégation des deux entités (montmorillonite et bactéries). Cependant, un espace entre les feuillets de montmorillonite et la paroi bactérienne mesurant environ un dixième de micromètre ne répond ni à la coloration des protéines (§3.10.3.2) ni à la coloration des polysaccharides (§3.10.3.3), suggérant une densité de polymères trop faible pour être visualisés. La figure 6.5 montre une bactérie en présence de feuillets de montmorillonite dont la coupe a subi une coloration spécifique des polysaccharides avant observation. La membrane bactérienne est très bien contrastée, mais aucun marquage n'apparaît entre la paroi et les feuillets.



Figure 6.6. Bactérie (x22000) (*Burkholderia cepacia*) et feuillets de montmorillonite (Coloration spécifique des polysaccharides)

Nous avons réalisé à partir des photos prise en MET avec ou sans coloration spécifique un comptage des bactéries que présentent une “agrégation avec les feuillets de montmorillonite”. Sur 33 clichés, seulement 50% montrent une présence d’argile à proximité de la paroi. En posant une hypothèse de répartition dans l’espace identique à celle en deux dimensions, une estimation très aléatoire du pourcentage de couverture des bactéries donne un chiffre de 30% sur 50% des bactéries photographiées en présence de montmorillonite, soit au total 15% de la surface bactérienne, avec un maximum de microorganismes recouverts à 20%. Ce recouvrement partiel des microorganismes peut expliquer la diminution de la biodisponibilité du naphthalène. Une hypothèse de limitation du passage du substrat à travers la membrane par la montmorillonite constituant un obstacle à la diffusion du naphthalène est possible. Cependant, l’estimation d’un pourcentage de recouvrement des microorganismes par la montmorillonite à partir de ces clichés, comporte une erreur importante. Le nombre limité de photos à notre disposition, ainsi que des images bidimensionnelles sont source d’erreurs importantes.

Ce faible pourcentage de 15%, entaché d’une erreur importante, ne permet pas d’expliquer à lui seul la diminution des vitesses de biodégradation du naphthalène constatées en présence de montmorillonite. En effet, les cinétiques de biodégradation sont réduites de trois fois environ en présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite.

6.3.1.2. Biodégradation du naphthalène avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite à différentes vitesses d’agitation

Cette expérience de biodégradation du naphthalène réalisée avec et sans agitation d’une suspension de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite de sodium, a pour but de monter l’influence du transfert de masse externe. Les essais ont été réalisés avec des vitesses d’agitation des barreaux magnétiques de 0rpm, 250rpm et 500rpm. Au temps zéro, l’inoculum contenant *Burkholderia cepacia* adaptée au naphthalène est ajouté aux flacons essais et la concentration dans les flacons est de $1,8 \cdot 10^6 \text{UFCmL}^{-1}$. La figure 6.1 montre l’évolution de la concentration en naphthalène pour les essais de biodégradation et les témoins. Chaque point est une moyenne réalisée sur un triplicat et les résultats bruts sont donnés en annexe 20).

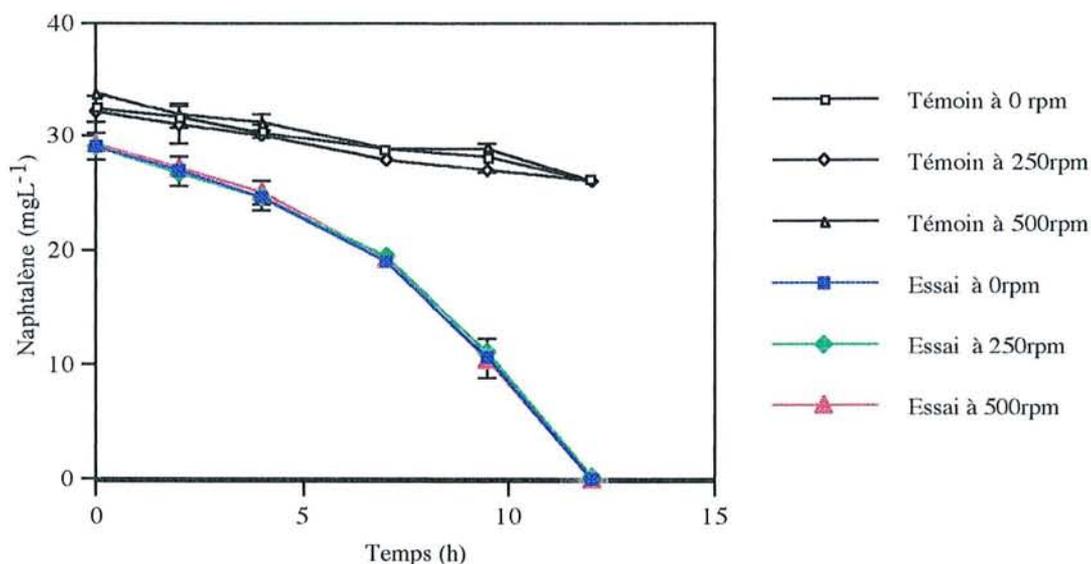


Figure 6.6. Biodégradation du naphthalène par *Burkholderia cepacia* dans une suspension de 0,5gL⁻¹ de montmorillonite à une température de 30°C sous différentes vitesses d'agitation.

L'évolution des courbes témoins montre une perte en naphthalène par volatilisation de 20% en 12 heures quelle que soit l'agitation. Cette perte correspond à la moyenne calculée sur l'ensemble des essais (§4.3.1). Les courbes représentant les essais de biodégradation montrent une baisse par biodégradation de la concentration en naphthalène. Cette baisse est la même quelles que soient les vitesses d'agitation : les courbes se superposent parfaitement.

Les cinétiques traduites en termes de vitesses et de constantes de dégradation du premier ordre (§3.11.5) (Tableau 6.2) confirment que la biodégradation du naphthalène est identique dans tous les essais. Les valeurs des vitesses et des k ne sont pas différentes au seuil de 0,05 (Test de Student).

Tableau 6.2. Paramètres de biodégradation du naphthalène pour des vitesses d'agitation différentes

Vitesse d'agitation	0rpm	250RPM	500RPM
*Vitesse maximale (mgL ⁻¹ h ⁻¹)	3,24 (0,86)	2,73 (0,41)	3,44 (0,28)
* k (h ⁻¹)	0,044 (0,006)	0,040 (0,001)	0,045 (0,002)
Température (°C)	30 (±1)	31 (±1)	32 (±1)

* Les vitesses et les k ont été calculés sur les valeurs de volatilisation déduite

Seule la température diffère légèrement entre chaque essai. Elle est plus élevée de 2°C dans les flacons agités que dans les flacons non agités. Cette augmentation est due à l'échauffement par le barreau et la table d'agitation. Malgré cette élévation de température de 2°C dans les batchs agités à 500rpm, il n'existe pas de différence entre les 3 courbes moyennes de dégradation pour chaque vitesse d'agitation. Une différence de 2°C n'a dans ces conditions opératoires aucune influence sur

la biodégradation du naphthalène par *Burkholderia cepacia*. La constante de dégradation moyenne est $k=0,043 (0,004)h^{-1}$ et la vitesse maximale de dégradation est $V_{max}= 3,14 (0,59) mgL^{-1}h^{-1}$.

Les résultats de cette expérience indiquant que l'agitation ne modifie pas les cinétiques de biodégradation montrent que le transfert de masse externe n'est pas limitant.

6.3.1.3. Diffusion du naphthalène à travers une membrane : Influence de la présence de montmorillonite

Cette expérience de diffusion du naphthalène à travers une membrane a été réalisée dans l'objectif de confirmer que la diffusion du naphthalène dans l'eau n'était pas altérée par la présence de particules de montmorillonite en suspension et par conséquent que le transfert de masse externe n'explique pas la baisse de la biodisponibilité. L'appareillage utilisé (Descriptif §3.12) comprend deux cellules de mesure de même volume séparées par une membrane. Une cellule contient le naphthalène dissous dans le milieu minéral ou dans une suspension de $0,5gL^{-1}$ de montmorillonite et l'autre seulement du milieu minéral. Des prélèvements sont effectués dans chaque cellule et le naphthalène ayant diffusé à travers la membrane est dosé (§3.6). Les résultats sont présentés en figure 6.7.a sans montmorillonite et en figure 6.7.b avec $0,5gL^{-1}$ de montmorillonite dans le milieu naphthalène (Résultats bruts en Annexe 21). Chaque droite représente un essai.

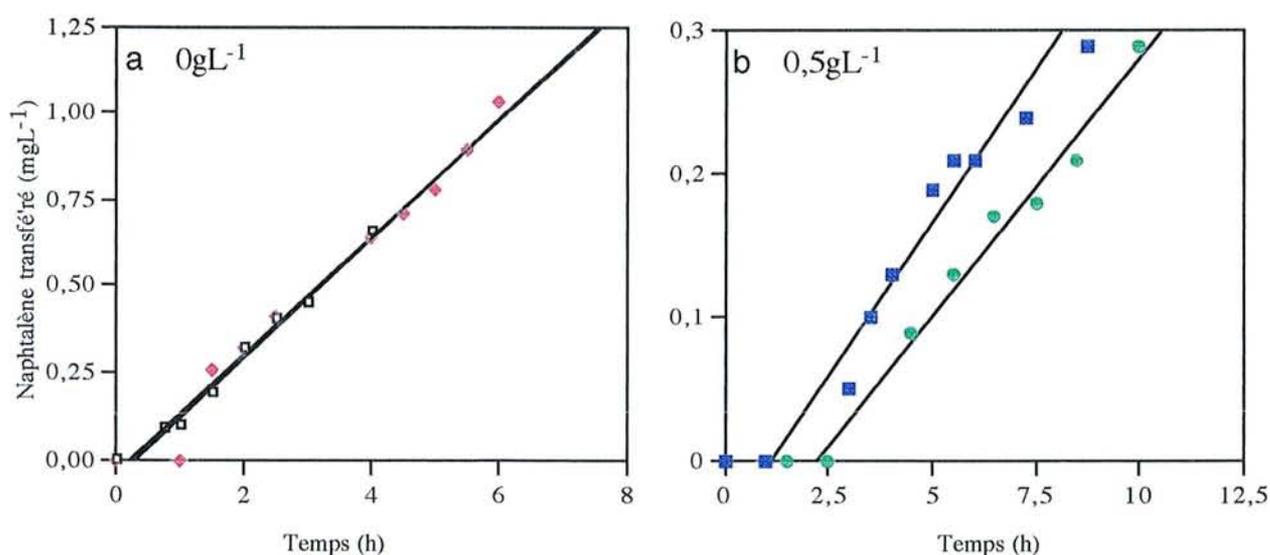


Figure 6.7. Transfert du naphthalène à travers une membrane Millipore à partir un milieu minéral a) ou à partir d'une suspension de $0,5gL^{-1}$ de montmorillonite b)

Les courbes de la figure 6.7 montre un transfert linéaire en fonction du temps du naphthalène à travers la membrane. Pour chaque expérience, environ 10% du substrat a diffusé à travers la membrane. Les calculs de pente indiquant le flux transféré ont été réalisés sans prise en compte de la phase de latence et sont reportés dans le tableau 6.3 en fonction des concentrations initiales en naphthalène.

Tableau 6.3. Concentrations initiales en naphthalène et flux de naphthalène transféré (pente)

Montmorillonite (gL^{-1})	Naphtalène initial C_i (mgL^{-1})	Flux de naphtalène transféré ($\text{mgL}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Flux/ C_i (10^{-3}h^{-1})
0	26,9	0,170	6,32
0	23,5	0,173	7,36
0,5	5,55	0,043	7,74
0,5	3,90	0,036	9,23

Il est possible d'approximer la diffusivité du naphthalène à travers une membrane par la formule de Crank reprise par Mignot et Junter (1990) (§3.11.7) :

$$D = A^{-1} L K_p^{-1} C_i^{-1} \Phi$$

avec A : Surface de la membrane, L : épaisseur de la membrane, K_p : constante de partage du naphthalène entre la phase eau et la membrane, C_i : concentration initiale en naphthalène dans la cellule 1 et Φ le flux de naphthalène transféré calculé par la pente de la droite.

La diffusivité est proportionnelle au flux mais elle est aussi inversement proportionnelle à la concentration initiale.

En faisant les hypothèses que pour tous les essais, avec ou sans montmorillonite, (a) la surface de la membrane est la même, (b) l'épaisseur de la membrane reste inchangée et (c) la constante de sorption du naphthalène sur la membrane K_p est la même, un changement dans la diffusivité du naphthalène se traduit par un changement dans le rapport flux / concentration (Tableau 6.3).

Un test statistique de Student appliqué aux rapports flux/concentration initiale montre une différence non significative entre les résultats au seuil de 0,05. La diffusivité du naphthalène n'est pas modifiée par la présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite de sodium dispersée par sonication et agitation. Cette expérience confirme que la diffusion n'est pas en cause dans la limitation de la biodégradation du naphthalène en présence de montmorillonite.

6.3.1.4. Diffusion dans la couche limite

En se basant sur une hypothèse de couche limite d'une épaisseur maximale identique au diamètre moyen des particules ($2,2\mu\text{m}$ pour les particules montmorillonite+ bactéries et $60\mu\text{m}$ pour la B34 + bactéries), il est possible de calculer une constante cinétique du premier ordre k de biodégradation ou de désorption. Ainsi,

$$k = 6 D_\theta / d_v L$$

avec D_e diffusivité dans la phase eau ($D_e = 7,38 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ pour le naphthalène à 30°C , §3.11.6) et d_v est le diamètre moyen volumétrique des particules ($\varnothing_{\text{moyen}} \approx 2,2 \mu\text{m}$ pour le mélange montmorillonite et bactéries et $1,1 \mu\text{m}$ sans montmorillonite, Figure 6.1) et L l'épaisseur de la couche limite.

Des valeurs théoriques de k correspondant aux valeurs mesurées expérimentalement suggéreront que la diffusion externe joue un rôle non négligeable et contrôle les cinétiques de désorption et de biodégradation du naphthalène. La comparaison des résultats théoriques et expérimentaux pour les deux matériaux, montmorillonite et argile organique B34, sont présentés dans le tableau 6.4.

Tableau 6.4. Comparaison des constantes cinétiques du premier ordre de biodégradation et de désorption théoriques et expérimentales

	k théorique (h^{-1})	k expérimental (h^{-1})
Biodégradation avec 0 à $0,5 \text{gL}^{-1}$ de montmorillonite	$3,3 \cdot 10^6$	$0,22 \ll 0,054$
Désorption à partir de B34	$4,4 \cdot 10^3$	2
Biodégradation avec 0 à 1gL^{-1} de B34	$4,4 \cdot 10^3$	$0,034 \ll 0,158$

Le tableau montre des résultats théoriques plus grands que les résultats expérimentaux d'un facteur au moins égal à 2000. Si le transfert du naphthalène dans la couche limite autour des particules de montmorillonite ou d'argile organique B34 limite les cinétiques de biodégradation ou de désorption, les valeurs expérimentales devraient être au moins égales aux valeurs théoriques. Ainsi comparées, la diffusion externe ne peut expliquer les faibles valeurs de désorption et de biodégradation : elle n'est pas limitante.

Rijnaarts *et al.*, (1990) ont calculé, à partir des valeurs de k mesurées, des épaisseurs de couche limite de l'ordre de quelques mètres (de 1m à presque 100m) ne sont pas réalistes et indiquent, comme pour la montmorillonite, que le transfert de masse externe n'est pas le facteur limitant la biodégradation.

6.3.2. Transfert de masse interne du naphthalène dans l'argile organique B34

Ce paragraphe est consacré à l'hypothèse de limitation de la biodisponibilité du naphthalène par une limitation du transfert de masse interne. L'argile organique B34 est constituée d'une montmorillonite sur laquelle est adsorbé un tensioactif à deux chaînes linéaires carbonées. Cette argile organique possède un espace interfoliaire de 2,4nm environ qui augmente de 1,2 nm en présence de naphthalène (§4.3.4). L'expérience de gonflement de l'argile organique B34 par le naphthalène montre que le naphthalène est une molécule capable de se localiser à l'intérieur des feuillets. De surcroît, le naphthalène n'est pas retenu par la montmorillonite, mais c'est le tensioactif, localisé principalement à l'intérieur des feuillets qui tient lieu de "support".

L'argile organique B34 peut être assimilée à un système microporeux dans laquelle le naphthalène hydrocarbure hydrophobe vient se loger. Sur ces bases, il est possible d'imaginer une limitation de la biodisponibilité du naphthalène par un transfert de masse interne (diffusion intraparticulaire) lente.

La diffusivité intraparticulaire du naphthalène D_{eff} peut être approchée à l'aide à la formule simplifiée, développée par Wu et Gschwend (1986) (§3.11.9) et reprise et employée par Mihelcic and Luthy (1991).

$$D_{\text{eff}} = (D_e n^2) / \{(1-n)\rho_s K_p\}$$

avec D_e diffusivité du naphthalène dans l'eau à 30°C ($7,38 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$), n la porosité du solide, ρ_s la densité du solide et K_p le coefficient de partage du naphthalène entre l'argile organique et l'eau.

Pour appliquer la formule de calcul de la diffusivité du naphthalène à l'intérieur des pores de l'argile organique B34, la porosité du solide B34 ainsi que sa densité ont du être estimées. En effet, connaissant l'espacement interfoliaire de l'argile organique (2,5nm environ) et l'épaisseur d'un feuillet de montmorillonite (0,96nm, Bruant, 1986), la porosité est égale au rapport 1,54nm / 2,5nm, soit 0,6.

La densité du solide peut être appréciée à partir de la densité de la montmorillonite (environ 2, Bruant, 1986), et de celle du tensioactif, inconnue mais certainement proche de celle de l'acide stéarique qui vaut 0,85. Sachant que 325mg de surfactant sont adsorbés par gramme d'argile organique B34, la densité de la B34 vaut 1,72.

Ainsi, la diffusivité du naphthalène à travers l'espace interfoliaire de la B34 est calculée égale à $6,52 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Cette valeur est environ dix mille fois plus faible que la diffusivité du naphthalène dans l'eau. En appliquant le même raisonnement qu'au paragraphe 6.3.1.4, une constante cinétique de $0,78 \text{ h}^{-1}$, supérieure à celles de biodégradation mesurées et donc non limitante.

De plus, les résultats du chapitre 5 montrent que les cinétiques de désorption, mesure globale de la désorption et de la diffusion, sont rapides (équilibre atteint en moins de 2 heures) et non limitantes de la biodégradation. Dans ces conditions, on peut estimer que la diffusion intraparticulaire joue un rôle négligeable dans la limitation de la biodégradation du naphthalène en présence de l'argile organique B34.

6.3.3. Biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et le milieu échangé ("surnageant de montmorillonite")

Cette étude de biodégradation du naphthalène dissous dans un surnageant de montmorillonite a pour but de montrer l'influence de la concentration en ions présents dans le milieu minéral et dans le surnageant de montmorillonite. En effet, la montmorillonite sodique, comme toutes les argiles, possède une capacité d'échange cationique élevée (95meq/100g, §3.4). En présence de cations dissous, la montmorillonite échange une partie des ions sodium contre d'autres cations en solution (Tableau 6.5).

Tableau 6.5. Dosage des éléments cationiques présents dans le milieu minéral, dans le surnageant de montmorillonite ou dans le surnageant de B34

Cation (mgL ⁻¹)	Milieu minéral	Surnageant montmorillonite	Surnageant B34
Na ⁺	2,7	10,9	3,5
NH ₄ ⁺	15,2	10,6	14,8
K ⁺	5,7	5,3	5,8
Zn ²⁺	6.10 ⁻³	30.10 ⁻³ (?)	≤1.10 ⁻³
Mn ²⁺	5.10 ⁻³	2.10 ⁻³	≤1.10 ⁻³
Cu ²⁺	3.10 ⁻³	nd	nd
Fe ²⁺	nd	450.10 ⁻³ (?)	40.10 ⁻³ (?)

nd : non détecté

Un dosage de la concentration en ions ammonium présents dans le surnageant de 0,5gL⁻¹ de montmorillonite révèle un manque de 25% (dosage §3.8) à 30% en masse (dosage par absorption atomique) de ces ions. La concentration initiale en NH₄⁺ dans le milieu minéral (§3.2) de 13,45mgL⁻¹ soit 40mgL⁻¹ de NH₄Cl. Après 1 heure de temps de contact avec 0,5gL⁻¹ de montmorillonite, il ne reste dans la solution que 10,6mgL⁻¹ de NH₄⁺. 5% du potassium ont aussi été retenu par la montmorillonite et au total 18% des cations initialement présentes en solution, métaux y compris (exprimés en milliéquivalents de sodium) ont été échangés contre le sodium. En prenant pour valeur de la CEC de la montmorillonite 95meq/100g, et un relargage de 8,2mgL⁻¹ de Na, 75% des ions sodium saturant la montmorillonite ont été échangés.

Les fortes concentrations en zinc et fer retrouvées dans le surnageant de montmorillonite et de B34 sont difficiles à expliquer. Il est peu probable qu'ils proviennent d'une contamination due à l'argile, peut-être d'une contamination de la verrerie de laboratoire.

Par contre, en présence d'argile organique B34, l'échange est beaucoup moins sensible : seuls 3% des ions ammonium et un total de 2% (calcul sur le sodium exprimé en meq) de l'ensemble des cations ont été échangés. Cet échange d'un tout autre ordre de grandeur s'explique par le fait que le nombre de cations échangeables (sodium), si l'on considère le surfactant non dissociable de la B34 (Annexe 5), n'est que de 14meq/100g contre 95meq/100g pour la montmorillonite. Cependant, 60% de ions sodium de la B34 ont été échangés.

Afin de déterminer l'influence du piégeage de cations par la montmorillonite, un essai de biodégradation du naphthalène dissous dans le milieu minéral (§3.2) et dans le "surnageant de montmorillonite" a été réalisé. La figure 6.8 montre l'évolution de la concentration en naphthalène du témoin abiotique, et des essais de biodégradation dans le milieu minéral et dans le "surnageant de montmorillonite" (échange de 18% de cations par du sodium). Les résultats bruts sont donnés en annexe 22.

De par leur forme, les courbes sont difficiles à interpréter. En effet, le point à $t=2h30$ pour le surnageant de montmorillonite est décalé. Ceci est dû à une valeur élevée d'une des valeurs du triplicat : deux valeurs sont à 21mgL^{-1} et une valeur est à $23,5\text{mgL}^{-1}$

Les huit premières heures ont été considérées comme une phase de latence (sans dégradation du naphthalène).

Après un temps de 12h, un net décalage est visualisé entre les courbes de biodégradation du naphthalène réalisées dans le milieu minéral et dans le milieu "surnageant de montmorillonite".

Les concentrations en azote N et phosphore P présentes dans le milieu minéral ont été calculées pour permettre une croissance bactérienne sur 30mgL^{-1} de naphthalène. La rétention, entre autre, de 25% à 30% des ions NH_4^+ ne limite pas l'apport d'éléments minéraux pour cette expérience réalisée avec 20mgL^{-1} de naphthalène, mais est limitante pour l'expérience de biodégradation du naphthalène à une concentration initiale de 30mgL^{-1} (§5.2.1.2). C'est pourquoi un doublement de la population bactérienne est observé en 26 heures dans les deux milieux.

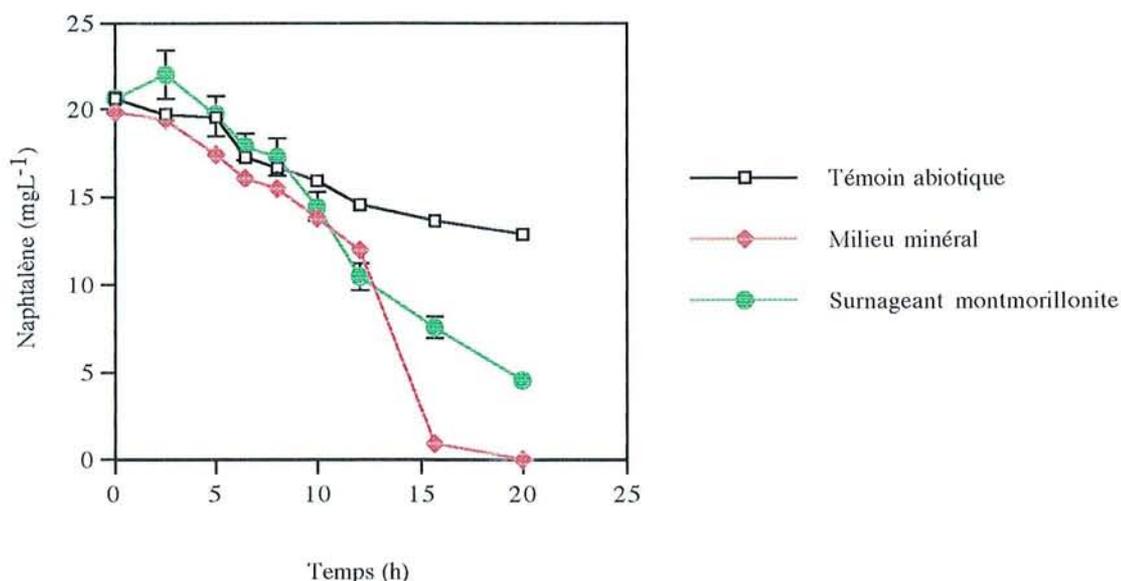


Figure 6.8. Evolution de la concentration en naphthalène dans un milieu minéral et dans un surnageant de montmorillonite en présence de $2,5 \cdot 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ (*Burkholderia cepacia*) à 30°C sous agitation magnétique (500rpm) (n=3)

Les vitesses maximales de dégradation du naphthalène ainsi que les constantes cinétiques du premier ordre ont été calculées après déduction de la volatilisation dans le tableau 6.7.

Tableau 6.7. Vitesses maximales et constantes cinétiques de biodégradation du naphthalène dans le milieu minéral et dans le surnageant de montmorillonite

		Vmax (mgL ⁻¹ h ⁻¹)	k (h ⁻¹)
Volatilisation déduite	Milieu minéral	2,76 (0,12)	0,41 (0,01)
	Surnageant	1,68 (0,05)	0,13 (0,01)

Les valeurs entre parenthèses sont les écarts-types

Il est évident, au vu de ces résultats, que l'échange d'éléments minéraux par la montmorillonite contre du sodium limite la biodégradation du naphthalène comparativement au milieu minéral. Cet échange explique une limitation de croissance lorsque les concentrations en montmorillonite augmentent (§5.2.1.2), mais ne joue qu'un rôle mineur dans la biodisponibilité du naphthalène avec l'argile organique B34.

6.4. Discussion

La diminution de la biodisponibilité du naphthalène en présence de montmorillonite de sodium n'est pas liée à la sorption ni à la diffusion intraparticulaire puisque l'argile ne retient pas le naphthalène. La désorption du naphthalène à partir l'argile organique B34 n'en est pas non plus responsable car les vitesses de désorption ont été mesurées plus rapides que celles de biodégradation. Les cinétiques de désorption sont plus élevées d'environ 10 fois que celles de biodégradation (Chapitre 5). Rijnaarts *et al.* (1990), de même que Mihelcic et Luthy (1991) ont fait les mêmes constatations avec de l' α -hexachlorocyclohexane et du naphthalène dans des suspensions de sol.

Plusieurs hypothèses ont été soulevées : limitation du transfert de masse externe pour la montmorillonite, limitation du transfert de masse interne (B34) et limitation par rétention d'éléments minéraux.

L'agrégation des microorganismes avec les particules de montmorillonite et d'argile organique B34 a été observée par la mesure de la taille des particules en diffraction laser mais aussi par des observations en microscopie électronique à transmission. En effet, une "couverture" partielle par la montmorillonite des bactéries calculée de 15% peut limiter les échanges membranaires : passage du substrat, de l'oxygène et autres nutriments. Malgré cette association bactéries/montmorillonite, les 15% calculés ne permettent pas d'expliquer entièrement une baisse d'un facteur 3 des cinétiques de biodégradation pour la concentration la plus élevée en particules.

Les expériences de biodégradation en fonction des vitesses d'agitation et de diffusivité à travers une membrane montrent que le transfert de masse externe n'est pas le facteur limitant la biodisponibilité du naphthalène en présence de particules de montmorillonite. En effet, les cinétiques de biodégradation du naphthalène ne sont pas affectées par une agitation à des vitesses de 0, 250 ou 500rpm. Généralement, le transfert externe est négligeable et négligé dans tout système agité (Mihelcic et Luthy, 1991; Rijnaarts *et al.*, 1990; Stapleton *et al.*, 1994; Wu et Gschwend, 1986).

Mignot et Junter (1990) ont montré que la diffusion de l'acide malique et du glucose dans un gel d'agar est limitée par le nombre de microorganismes présents dans le gel. Plus le nombre de bactéries est élevé, plus la diffusion est lente. Ainsi, la présence de microorganismes offre une résistance à la diffusion proportionnelle à la quantité de bactéries présentes : des concentrations de 10^7 à 10^{12} microorganismes par litre ont été employées. Au contraire, dans nos expériences, la diffusion du naphthalène n'est pas modifiée par la présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite (§6.3.1.2).

De surcroît, un calcul théorique des constantes cinétiques réalisé avec une hypothèse de limitation par le transfert de masse externe montre que les cinétiques de biodégradation ou de désorption devraient être au moins 2000 fois plus rapides pour commencer à être affectées par la diffusion externe. Rijnaarts *et al.* (1990) montrent également, en calculant des valeurs d'épaisseur

de couche limite beaucoup trop élevées et non réalistes (de l'ordre de 10m) pour des particules de sol dans des suspensions agitées que la diffusion externe est négligeable.

Le calcul de la diffusivité intraparticulaire du naphthalène *i.e.* à l'intérieur des pores de l'argile organique B34 aboutit à une valeur de $6,52 \cdot 10^{-14} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ comparativement à une diffusivité de $7,38 \cdot 10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ pour la phase aqueuse. La littérature donne des ordres de grandeur de la diffusivité intraparticulaire de 10^{-13} à $10^{-16} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ et la valeur trouvée s'inscrit tout à fait dans la gamme donnée par Wu and Gschwend (1986). Par ailleurs, Zhang *et al.*, (1995) ont calculé une diffusivité intraparticulaire du naphthalène de $3,15 \cdot 10^{-13} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ à une température de 22°C pour un sol contaminé.

Cependant, la valeur de porosité 0,6, calculée pour l'argile organique B34, est élevée par rapport aux valeurs de la littérature comprises entre 0,07 et 0,18 pour les sols et les sédiments (Wu et Gschwend, 1986) ou égale à 0,4 (Zhang *et al.*; 1995). Mihelcic et Luthy ont d'ailleurs employé une valeur moyenne de 0,13 empruntée à Wu et Gschwend (1986). Cette forte porosité peut s'expliquer par le fait que l'argile organique B34 est une argile expansive dont l'espace interfoliaire peut être partiellement contrôlé en y ajoutant un autre matériau.

Cependant, il est improbable que la diffusivité intraparticulaire soit la cause de la limitation de la biodisponibilité. En effet, les études de cinétique et des isothermes d'adsorption et de désorption du naphthalène montrent des cinétiques très rapides (de l'ordre de 2 heures) ainsi qu'une réversibilité totale du partage de phase du naphthalène entre la phase eau et la phase solide. Dans le cas d'une limitation par la diffusion intraparticulaire, les cinétiques sont plus lentes (généralement quelques jours) de façon à ce que le composé puisse pénétrer à l'intérieur des particules. De surcroît, le modèle du premier ordre s'applique parfaitement aux valeurs expérimentales de la cinétique désorption. Les données de la littérature montrent généralement que le modèle du premier ordre ne convient pas lorsque la diffusion intraparticulaire joue un rôle important (Brusseau 1991; Rijnaarts *et al.*, 1990).

La limitation de la biodisponibilité du naphthalène en présence de montmorillonite de sodium combine certainement une agrégation bactéries / particules minérales et une limitation de éléments minéraux retenus par la montmorillonite et échangés avec le sodium : environ 30% des ions ammonium, 5% du potassium et presque tout le cuivre et le manganèse sont retenus par la montmorillonite. Le naphthalène est dégradé plus lentement dans un surnageant de montmorillonite dont certains cations ont été échangés avec du sodium. Par contre, la constitution du milieu minéral en présence de B34 ne joue qu'un rôle mineur dans la disponibilité du naphthalène.

La biodisponibilité du naphthalène en présence de B34 est limitée par des concentrations en solution plus faibles et donc moins substrat directement disponible pour *Burkholderia cepacia*. Comme le montre l'expérience sur le rapport S_0/X_0 (§5.3.4), les cinétiques sont directement fonction de la concentration en solution : plus la concentration est faible, plus la vitesse est lente. Malgré une vitesse de désorption non limitante, la biodisponibilité du naphthalène est réduite par piégeage du substrat sur l'argile organique B34.

6.5. Conclusion

En conclusion de ce chapitre sur la biodisponibilité du naphthalène, il apparaît que malgré une diversité dans les capacités adsorptives des supports testés, une montmorillonite de sodium n'adsorbant pas du tout le naphthalène et l'argile organique B34 retenant de fortes quantités d'hydrocarbure ($K_p=5,92L.g^{-1}$), la modification de la biodisponibilité du naphthalène n'est due ni à la sorption, ni au transfert de masse externe, ni au transfert de masse interne (diffusion intraparticulaire). En effet, les cinétiques de désorption du naphthalène à partir de l'argile organique B34 sont plus élevées que celles de biodégradation. De plus, le transfert de masse externe ne peut être mis en cause puisque les expérimentations sont réalisées dans des systèmes agités. Enfin, malgré une diffusion intraparticulaire 10000 fois plus faible que dans la phase aqueuse, celle-ci ne peut être incriminée dans nos expériences. En effet, la désorption est rapide (<2 heures) et complètement réversible.

Ces mécanismes souvent cités dans la littérature ne semblent pas dominer dans nos expériences.

Les explications trouvent en fait leur source dans le domaine de la microbiologie. En effet, les paramètres biologiques sont souvent mésestimés dans la limitation de la biodisponibilité. L'agrégation microbienne avec les particules ainsi qu'un piégeage important des éléments inorganiques par la montmorillonite expliquent des conditions non optimales à la dégradation par les microorganismes. De surcroît, la présence d'argile organique B34 réduit les concentrations de substrat en solution par sorption et par conséquent le substrat directement disponible pour les bactéries.

6.6. Références bibliographiques

- BRUANT M., 1986,
Etude de la déstabilisation de suspensions de montmorillonite par des polymères organiques et inorganiques,
Thèse de l'INPL, 28 octobre 1986, 218 pages.
- BRUSSEAU M.L., 1991,
Cooperative sorption of organic chemicals in systems composed of low carbon in aquifer materials,
Environ. Sci. Technol., 25, 1747-1752.
- BURNS R.G., 1980,
Chapter 14, in *Microbial adhesion to surfaces*, R.C.W. Berkekey, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter and B. Vincent (eds), Ellis Horwood, Chichester, UK.
- CHOTTE J.L., L. JOCTEUR MONROZIER, G. VILLEMIN and F., TOUTAIN , 1992,
Effet du mode de dispersion du sol sur la localisation de sa biomasse microbienne, cas d'un vertisol,
Cah. Orstom, Sér. Pédol., 1, 81-95.
- MANITAL V. B. and M. ALEXANDER, 1991,
Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 35, 401-405.
- MIGNOT L. and G.A. JUNTER, 1990,
Diffusion in immobilized-cell agar layers : influence of microbial burden and cell morphology on the diffusion coefficients of L-malic acid and glucose,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 418-423.
- MIHELICIC J.R. and R.G. LUTHY, 1991,
Sorption and microbial degradation of naphthalene in soil-water suspensions under denitrification conditions,
Environ. Sci. Technol., 25, 169-177.
- QUIQUAMPOIX H., 1987a,
A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil I. Effect of electrostatic interactions on the conformation of a β -D-galactosidase adsorbed on different mineral surfaces,
Biochimie, 69, 753-763.
- QUIQUAMPOIX H., 1987b,
A stepwise approach to the understanding of extracellular enzyme activity in soil II. Competitive effect ofn the adsorption of a β -D-galactosidase in mixed mineral and organo-mineral systems,
Biochimie, 69, 765-771.
- QUIQUAMPOIX H., S. STAUNTON, M.H. BARON and R.G.RATCLIFFE, 1993,
Interpetation of the pH dependence of protein adsorption on clay mineral surfaces and its relevance to the understanding of extracellular enzyme activity in soil,
Colloids Surface, 75, 85-93.
- RIJNAARTS H.H.M., A. BACHMANN, J.C. JUMELET and A.J.B. ZEHNDER 1990,
Effect of desorption and intraparticle mass transfert on the aerobic biomineralization of α -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil,
Environ. Sci. Technol., 24, 1349-1354.

- SCOW K.M. and M. ALEXANDER, 1992,
Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation : experimental results with synthetic aggregates,
Soil Sci. Soc. Am. J., **56**, 128-134.
- SIMKINS S. AND M. ALEXANDER, 1984,
Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density,
Appl. Environ. Microbiol., **47**, 1299-1306.
- STAPLETON J.M., J.R. MIHELICIC and D.R. LUEKING, 1994,
Adsorption and desorption kinetics of pyrene onto a Great Lakes sediment,
J. Great Lakes Res., **20**, 561-568.
- STAUNTON S. and H. QUIQUAMPOIX, 1994,
Adsorption and conformation of bovine serum albumine on montmorillonite: modification of the balance between hydrophobic and electrostatic interactions by protein methylation and pH variation,
J. Colloid interface Sci., **166**, 89-94.
- SMITH M.R., 1994;
The physiology of aromatic hydrocarbon degrading bacteria,
in *Biochemistry of Microbial Degradation*, C. Ratledge (Ed), Kluwer Academic Publishers, London, 347-378.
- WEBER J.B. and H.D. COBLE, 1968,
Microbial decomposition of diquat adsorbed on montmorillonite and kaolinite clays,
J. Agri. Food Chem., **16**, 475-478.
- WU S.C. and P.M. GSCHWEND, 1986,
Sorption kinetics of hydrophobic organic compound to natural sediments and soils,
Environ. Sci. Technol., **20**, 717-725.
- ZHANG W., E. BOUWER, L. WILSON and N. DURAN, 1995,
Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms,
in *Wat. Sci. Technol.*, **31**, 1-14.

CHAPITRE 7

CONCLUSIONS GENERALES

L'objectif de ce travail de recherche visait à déterminer les paramètres limitant la biodisponibilité d'un polluant organique, le naphthalène, en présence de particules solides en suspension. Le travail de recherche s'est organisé en trois étapes successives. La première étape menée avait pour but la caractérisation des systèmes utilisés (conditions abiotiques), et tout particulièrement le comportement physico-chimique du naphthalène en solution lors d'ajout de suspensions argileuses. La seconde étape du travail a permis, par l'intermédiaire d'essais de biodégradation, de visualiser des modifications de la biodisponibilité de l'hydrocarbure. Enfin, la troisième partie tente d'expliquer les mécanismes limitant la biodisponibilité pour chaque système testé contenant des particules en suspension.

Le naphthalène, hydrocarbure aromatique de faible masse moléculaire, est un composé volatil. Une perte moyenne de 20% a été constatée parmi 66 essais abiotiques pour des temps de mesure compris entre 10 et 25 heures et pour 6 à 8 ouvertures de flacons. L'ouverture successive permet d'expliquer un équilibre entre la phase eau et la phase gazeuse jamais atteint et la perte au cours du temps suit une loi du premier ordre dont la constante cinétique a été estimée à $k=0,012\text{h}^{-1}$. Les valeurs des témoins de volatilisation, exploitées expérience par expérience, ont permis de compenser les valeurs des concentrations mesurées de naphthalène des pertes par volatilisation au cours du temps.

A partir des expériences réalisées en conditions abiotiques, les particules solides ont été classées en trois catégories en fonction de leur capacité de rétention du naphthalène : un support minéral hydrophile, la montmorillonite sodique, ne retenant pas le naphthalène ($K_p=0\text{mgL}^{-1}$), deux matériaux retenant le naphthalène dans de faibles proportions, le complexe montmorillonite/polyacrylamide ($K_p=40\text{mgL}^{-1}$) et le sédiment de rivière ($K_p=20\text{mgL}^{-1}$) et enfin un support possédant une très forte affinité pour le naphthalène, l'argile organique B34 ($K_p=5920\text{mgL}^{-1}$). De plus, la réversibilité totale de l'équilibre de sorption du naphthalène avec l'argile organique B34 permet de conclure qu'il s'agit d'un partage de phase entre le milieu aqueux et le tensioactif adsorbé sur la montmorillonite (constituant la B34). Dans toutes les expériences réalisées, la sorption (adsorption et désorption) sont des processus rapides puisque les pseudo-équilibres sont atteints en deux heures environ.

L'étape suivante du travail de recherche a consisté en l'étude de la biodégradation du naphthalène par une souche bactérienne pure (*Burkholderia cepacia*) dans les suspensions constituées des quatre matériaux précédemment cités.

Les cinétiques de biodégradation ne sont pas modifiées en présence de complexe montmorillonite/polyacrylamide à des concentrations comprises entre 0 et $0,5\text{gL}^{-1}$. La concentration en solide est trop faible pour observer des modifications significatives.

Les résultats des essais de biodégradation du naphthalène en présence de sédiment (concentrations variant de 0 à 50gL^{-1}) sont difficiles à interpréter du fait de la complexité du milieu naturel constituant une source complémentaire de carbone et de microorganismes.

La limitation des cinétiques de biodégradation a été constaté de façon importante en présence de montmorillonite sodique : la cinétique est diminué par trois en présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de particules argileuses. La montmorillonite ne retenant pas le naphthalène, la sorption n'est pas tenue pour responsable de la limitation de la biodisponibilité.

De même, avec d'argile organique B34, la constante diminue de $0,158\text{h}^{-1}$ pour 0gL^{-1} de B34 à $0,073\text{h}^{-1}$ pour $0,5\text{gL}^{-1}$ de B34. Les cinétiques de désorption à partir de l'argile organique B34 étant plus élevées d'un facteur 10 que les cinétiques de biodégradation, la désorption n'est pas en cause dans la biodisponibilité du naphthalène en présence de B34.

La troisième phase du travail de recherche s'est attachée à comprendre et expliquer les paramètres qui modifient et contrôlent la biodisponibilité du naphthalène en présence de montmorillonite (support non adsorbant) et argile organique B34 (support adsorbant). L'hypothèse d'une limitation du transfert de masse externe (dans la couche limite) n'a pas été retenue suite à deux expérimentations réalisées avec la montmorillonite sodique, l'une sur l'influence de l'agitation sur les cinétiques de biodégradation et une seconde sur la modification de la diffusion du naphthalène dans une suspension. Confirmant les résultats expérimentaux, les calculs d'épaisseur de couche limite ont permis d'éliminer cette hypothèse. En effet, aucune modification n'est visualisée dans les cinétiques de biodégradation du naphthalène à différentes vitesses d'agitation avec $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite, de même que la diffusion ne semble pas altérée par la présence de la même concentration de montmorillonite.

Une limitation due au transfert de masse interne (à l'intérieur des particules de B34) a été également envisagée, mais, même si la valeur de diffusivité intraparticulaire calculée est faible, la cinétique de désorption mesurée incluant désorption et diffusion est rapide et non limitante. Tous ces éléments conduisent à une explication de la limitation de la biodégradation par la rétention du naphthalène par l'argile organique B34. La quantité de naphthalène en solution disponible est donc réduite par sorption du substrat sur la B34, induisant des cinétiques plus lentes.

L'explication de la limitation de la biodisponibilité du naphthalène dans un milieu de montmorillonite relève en fait d'une modification de l'équilibre chimique d'éléments minéraux cationiques présents dans le milieu minéral et échangés avec le sodium saturant la montmorillonite. Ainsi la quantité des éléments nutritifs initialement disponibles pour les microorganismes (N et P et métaux (cuivre, fer, zinc et manganèse) a diminué de 18% (exprimés en meq de sodium).

Par contre, ce mécanisme d'échange des éléments minéraux cationiques n'est pas observé en présence d'argile organique B34. Seuls 2% des cations (exprimés en meq de sodium) ont été remplacés par du sodium.

En conclusion, la biodisponibilité du naphthalène est directement fonction de ses propriétés physico-chimiques mais surtout de la nature du milieu dans lequel il évolue. Elle est principalement limitée, dans nos essais, par la non disponibilité des éléments minéraux piégés par l'adsorbant. Les résultats globaux publiés sur la limitation apparente de la biodisponibilité d'un produit devraient être revus à la lumière de nos observations.

ANNEXES

Annexe 1. Quantités de polyacrylamide neutre adsorbé par la montmorillonite

a) Complexe montmorillonite/polyacrylamide de poids moléculaire $2,5 \cdot 10^6$

621,4mgCL⁻¹ sont dosés dans le surnageant après centrifugation correspondent à 1225mgL⁻¹ de polyacrylamide (71g de polyacrylamides contiennent 36g de carbone). 1225mgL⁻¹ est la concentration d'équilibre de polyacrylamides dans le surnageant après 72h de contact entre 1g montmorillonite et 1,8g de polyacrylamides. La quantité de polyacrylamides neutres adsorbés ou fixés par la montmorillonite (**555 mgg⁻¹**) est calculée par différence entre la quantité initialement introduite (1,8) et la quantité restant dans le surnageant (1,225g).

Les lavages successifs ne révèlent qu'une très faible perte de carbone organique dissous de l'ordre de 2mgCL⁻¹ (≈ 4 mg de polyacrylamide L⁻¹) ce qui est négligeable par rapport à la quantité de produit adsorbé (555mgg⁻¹) : la perte représente environ 1% à chaque lavage.

b) Complexe montmorillonite/polyacrylamide de poids moléculaire 44000

744,4 mgCL⁻¹ (1488,7 mgL⁻¹ de polyacrylamides) sont dosés dans le surnageant. La quantité initiale de polyacrylamides 44000 ajoutés étant de 2,4g, 911mgL⁻¹ soit **455mg** de polyacrylamides sont adsorbé par g de montmorillonite.

c) Tableau récapitulatif

Tableau 1 : Quantités de naphthalène adsorbé sur le polyacrylamide

Poids moléculaire polyacrylamide	Polyacrylamide adsorbé (mgg ⁻¹ de montmorillonite)	Polyacrylamides adsorbés (mgg ⁻¹ de montmorillonite) (Bruant, 1986)
44000	455	220
$2,5 \cdot 10^6$	555	non testé
$3 \cdot 10^6$	non testé	675
$6 \cdot 10^6$	non testé	non testé

En 1986, Bruant réalise l'adsorption de polyacrylamides de diverses masse moléculaire et en particulier $3 \cdot 10^6$ ($2,5 \cdot 10^6$ ici utilisés). Il montre que environ 675mg de polyacrylamides s'adsorbent par gramme d'argile. La différence entre notre valeur (555mgg⁻¹) et la sienne (120mgg⁻¹) d'argile peut s'expliquer par la différence de masse moléculaire entre les 2 polyacrylamides utilisés.

Par contre, la quantité de polyacrylamides 44000 adsorbés sur l'argile est le double de celle trouvée par Bruant (1986) (455mg au lieu de 220mg). L'explication probable est que la

quantité de polyacrylamide adsorbé par Bruant (220mg) ne corresponde pas à la même partie de l'isotherme, *i.e.*; l'adsorption maximale n'a pas été atteinte (plateau).

Tableau 2: Dosage du COD (polyacrylamide) dans le surnageant de la préparation du complexe montmorillonite sodique/polyacrylamide ($PM = 2,5 \cdot 10^6$) (Dohrmann DC 80) après 72h de réaction et après centrifugation

COD (mgCL ⁻¹)	Dilutions	Essai 1	Essai 2	[COD] _{moyen}
Sans lavage	1/100	6,11	5,83	621,4
Sans lavage	1/50	13,76	12,07	(46)
2° lavage	-	2,37	2,65	2,51 (0,19)
3° lavage	-	2,56	3,06	2,81 (0,35)
EMQ	-	0,263	0,242	0,252 (0,15)

Tableau 3 : Dosage du COD (polyacrylamide) dans le surnageant de la préparation du complexe montmorillonite sodique/polyarylamide (44000) (Dohrmann DC 80 après 72h de réaction et après centrifugation

COD (mgCL ⁻¹)	Dilutions	Essai 1	Essai 2	[C] moyenne
Sans lavage	1/100	6,69	6,84	681,8
Sans lavage	1/10	69,27	68,14	(10)
1° lavage	-	50,66	52,76	51,71 (1,48)
2° lavage	-	6,57	6,36	6,46 (0,14)
3° lavage	-	4,07	3,73	3,90 (0,24)
EMQ	-	0,40	0,59	0,49 (0,12)

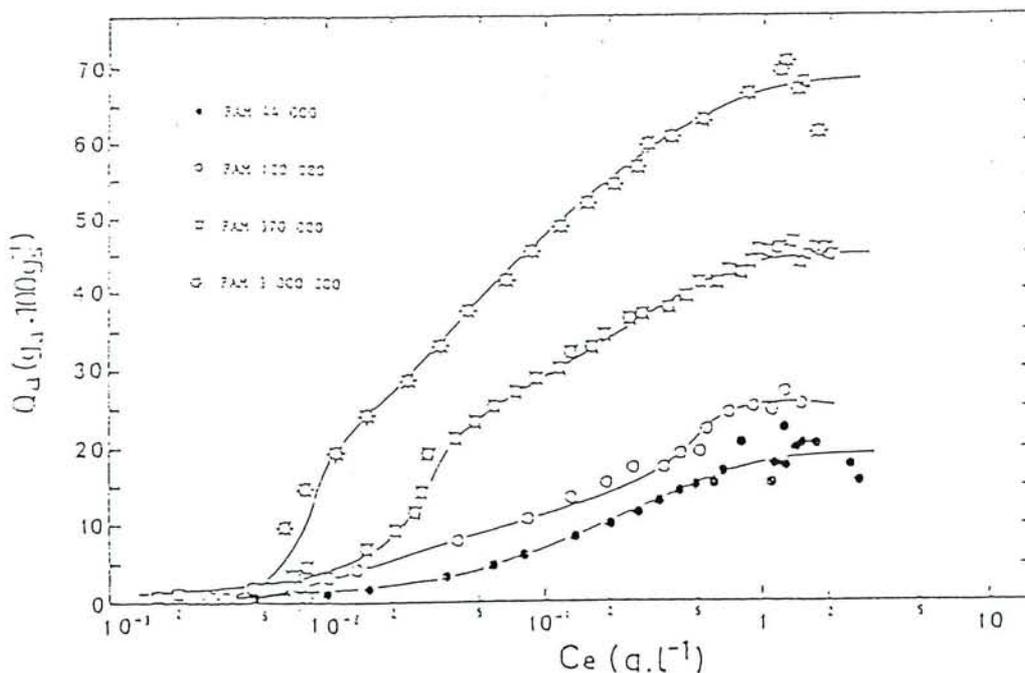


Figure 1. Isothermes d'adsorption de polyacrylamide neutre de différentes masses moléculaires sur de la montmorillonite de sodium (Bruant, 1986)

Annexe 2. Relargage de carbone par les flacons Téflon

Les résultats des tests de relargage de carbone des flacons téflon de 250 mL (réacteurs batchs) avant et après autoclavage sont donnés dans le tableau 4.1.

Tableau 4 : Mesure du carbone organique dissous après autoclavage d'eau Milli-Q dans les flacons Téflon

	COD (mgL ⁻¹)
Témoin eau Milli-Q	0,006 (0)
Sans autoclavage	0,123 (0,024)
Après autoclavage	0,158 (0,028)

Chaque valeur est la moyenne réalisée sur le duplicat.
Les écarts-types sont donnés entre parenthèses.

La faible quantité de carbone organique dissous apporté par les flacons en téflon (COD = 0,1mg de carbone par litre) ne peut être considérée comme une gêne. En effet, 0,1mg ne représente que 0,5 % de la quantité totale de carbone apporté pour les tests de biodégradation ou d'adsorption (20mgCL⁻¹).

Annexe 3. Relargage de carbone organique dissous (COD) par la montmorillonite de sodium purifiée (0,5gL⁻¹)

Protocole de relargage du COD par la montmorillonite sodique, le complexe montmorillonite / polyacrylamide, l'argile organique B34 et le sédiment :

50mg de montmorillonite sodique sèche et purifiée (§3.4.1) ou de complexe (§3.4.2) de B34 (§3.4.3) ou 100mg de sédiment sont placés dans 100mL d'eau Milli-Q dans des flacons Pyrex passés au four à 550°C. 2 flacons servent d'essai et 2 flacons ne contenant pas de montmorillonite mais subissant le même traitement servent de témoins. La suspension est agitée à l'aide de barreaux magnétiques recouverts de Téflon à une température de 30°C (±1) dans les flacons.

Des prélèvements sont réalisés à différents temps. Le carbone organique dissous est dosé au Dohrmann DC 80 (§3.5) après centrifugation des solutions à 45000g dans des tubes de centrifugation Téflon (Nalgène).

Tableau 5. Valeurs de COD

	COD (mgCL ⁻¹)					
	Temoin 1	Témoin 2	Moyenne	Essai 1	Essai 2	Moyenne
Eau Milli-Q	0,402	0,578	0,49 (0,12)	-	-	-
24 heures	0,784	0,862	0,690	0,652	0,768	0,664
	0,407	0,710	(0,199)	0,573		(0,098)
144 heures	0,370	0,312	0,536	0,566	0,596	0,680
	0,928	0,536	(0,277)	0,921	0,639	(0,163)

Les valeurs entre parenthèses sont les écart-types

La comparaison de 2 moyennes par le test de Student (cas des petits échantillons) permet de montrer que la quantité de carbone présente dans les essais avec et sans montmorillonite est la même. La montmorillonite ne relargue pas de carbone.

Principe du test de Student :

Le test de student permet la comparaison de 2 moyennes dans le cas de petits échantillons ($n < 30$).

Pour être significative au seuil de 95%, la différence d entre les 2 moyennes devra être supérieure à $t_{0,05} \cdot S_d$, S_d étant la variance standard de l'échantillon et $t_{0,05}$ le paramètre de Student au seuil de 95%.

A t = 24h : différence entre les 2 moyennes $d = 0,026$

$$t_{0,05} \cdot S_d = 0,946$$

$$t_{0,05} \cdot S_d = 2,18$$

$d \ll t \cdot S_d \Rightarrow$ les différences entre les moyennes ne sont pas significatives ni au seuil de 0,01, ni au seuil de 0,05.

A t = 144h : différence entre les 2 moyennes $d = 0,144$

$$t_{0,05} \cdot S_d = 1,38$$

$$t_{0,05} \cdot S_d = 3,18$$

$d \ll t \cdot S_d \Rightarrow$ les différences entre les moyennes ne sont pas significatives ni au seuil de 0,01, mais sont significatives au seuil de seuil de 0,05, soit à 5% d'erreur près.

En conclusion, la montmorillonite sodique purifiée (selon le protocole décrit au paragraphe 3.4.1) ne relargue pas de carbone organique dissous.

Annexe 4. Relargage de COD par 0,5gL⁻¹ de complexe montmorillonite/polyacrylamide

Tableau 6. Valeurs de COD

Temps (h)	Témoin Eau MQ (mg CODL ⁻¹)	Essais complexe (mg CODL ⁻¹)
0	0,354 (0,04)	0,364 (0)
24h	0,456 (0,12)	0,536 (0,26)
48h	0,407 (0,08)	0,512 (0,14)

Le test de Student montre que les différences entre le témoin eau et le complexe ne sont pas significatives : le complexe ne relargue pas de carbone.

Annexe 5. Relargage de COD par 0,5gL⁻¹ d'argile organique B34

La valeur moyenne du témoin EMQ est de 0,576 (0,115) mgL⁻¹

Tableau 7. Valeurs de COD

Intitulé	t= 0h	t = 8h	t = 24h
Moyenne témoins ^a	0,793 (0,019)	1,470 (0,263)	1,597 (0,487)
Moyenne essais ^b	-	2,228 (0,221)	0,805 (0,131)
COD relargué	-	0,758	- 0,793

^a Moyennes sur 2 valeurs

^b Moyennes sur 4 valeurs

Les valeurs à t=24 heures ne sont pas à prendre en compte. Le COD a du être dégradé durant ces 24h. En effet, les solutions de départ n'ont pas été stérilisées.

Environ 0,7mgL⁻¹ de carbone ont été relargués par l'argile organique, cette quantité de carbone reste négligeable par rapport à la quantité de carbone apporté par le polluant.

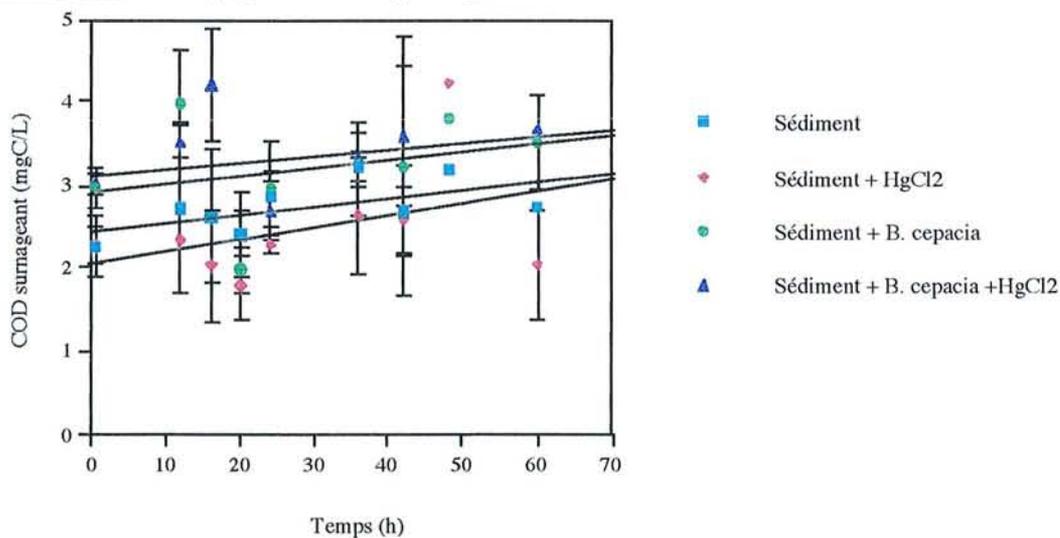
Annexe 6. Relargage de COD par 1gL⁻¹ de sédiment

Figure 2. Evolution du COD relargué par 1gL⁻¹ de sédiment de rivière sous divers conditions - Ajout de 50mgL⁻¹ de chlorure mercurique, ajout de 3.10⁷ *Bulkholderia cepacia*

La concentration de microorganismes provenant du sédiment et se multipliant sur gélose nutritive est de 10^4 microorganismes g^{-1} de sédiment.

Une légère augmentation du COD est constatée en fonction du temps correspondant à une concentration finale de 2,94 (0,63) $mgCODg^{-1}$ de sédiment. L'apport par l'eau Milli-Q est très faible (0,17 mgL^{-1}).

Tableau 8. Valeurs de COD (mgL^{-1}) relargué par le sédiment en présence de chlorure mercurique et/ou de microorganismes

Temps (h)	Sédiment	Sédiment + HgCl ₂	Sédiment + <i>B. cepacia</i>	Sédiment + HgCl ₂ + <i>B. cepacia</i>
0,5	2,26 (0,37)	2,28 (0,23)	2,96 (0,25)	3,01 (0,12)
12	2,73 (1,04)	2,33 (0,05)	3,98 (0,62)	3,52 (0,20)
16	2,62 (0,81)	2,03 (0,67)	-	4,19 (0,68)
20	2,41 (0,27)	1,80 (0,42)	1,97 (0,27)	2,40 (0,50)
24	2,85 (0,34)	2,28 (0,10)	2,97 (0,57)	2,69 (0,35)
36	3,21 (0,56)	2,63 (0,70)	3,23 (0,18)	3,31 (0,32)
42	2,69 (0,54)	2,58 (0,42)	3,22 (1,56)	3,59 (0,84)
48	3,18 (0)	4,23 (0,05)	3,78 (0)	-
60	2,75 (0)	2,04 (0,65)	3,50 (0,56)	3,67 (0)

Les écart-types sont entre parenthèses

Annexe 7. Choix du flaconnage

Le tableau 9 donne les résultats des dosages de naphthalène en solution après différents temps de séjour dans différents types de flacons sous agitation et à une température de 30°C.

Les flacons plasma sont bouchés à l'aide de septum en caoutchouc qui absorbent le naphthalène et laissent certainement aussi passer l'hydrocarbure qui permet d'expliquer une perte presque totale (94%). Par contre la perte dans les flacons téflon est moindre (33%), mais tout de même non négligeable.

Tableau 9 : Perte du naphthalène dans différents types de flaconnage en 4 jours

	Témoins		Flacons Plasma			Flacons téflon		
	1	2	1	2	3	1	2	3
Concentration (mgL^{-1})	16,62	16,19	1,15	0,92	0,95	11,19	10,86	10,84
Moyenne des concentrations	16,40 (0,30)		1,00 (0,12)			10,96 (0,19)		
% de perte			94%			33%		

Les valeurs entre parenthèses sont les écart-types

Annexe 8. Valeurs des cinétiques d'adsorption et de désorption du naphtalèneTableau 10. Naphtalène adsorbé (mgg^{-1}) sur la montmorillonitesodique

Temps (h)	Montmorillonite de sodium		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	0	0	0
6			0
8			0,1
23	0	0,78	
47	0	1,2	0
72	0	1	0
144	0	1,2	0

Tableau 11. Naphtalène adsorbé et désorbé (mgg^{-1}) sur le complexe

Temps (h)	Complexe 44000		Complexe $2,5 \cdot 10^6$	
	Adsorbé	Désorbé	Adsorbé	Désorbé
0	0 (0)	0	0	0
1	0 (0)		1,96 (0,08)	
4	0,88 (0,2)		1,63 (0,05)	
24	1,52 (0,96)		1,28 (0,09)	
46	1,92 (0,16)			
48		1,06 (0,22)	0,88 (0,22)	0,13 (0,08)
68	2,12 (0,92)			
72				

Tableau 12. Naphtalène adsorbé et désorbé (mgg^{-1}) sur l'argile organique B34

Temps (h)	Adsorbé			Désorbé		
	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0	0	0	0	0	0	0
0,2	16,02	16,04	16,38	3,18	3,36	3,2
0,5	19,26	17,88	18,14	3,44	3,70	3,34
1	20,68	19,1	18,42	3,52	3,70	3,50
1,5	20,66	18,98	19,06	3,70	3,74	3,32
2	20,18	18,56	19	3,36	3,74	3,42
3	20	18,62	19,44	3,40	3,86	3,32
4	20,86	18,78	18,18	3,34	3,76	3,34
18	20,19	19,12	18,04	2,94	3,74	3,12

Tableau 13. Naphtalène adsorbé (mg^{-1}) sur le sédiment de rivière

Temps (h)	Sédiment	Sédiment +HgCl ₂
0	0	0
0,25	1,19	0
0,25	1,24	0,72
0,25	1,38	1,29
0,5	0,96	1,06
0,5	1,63	1,19
0,5	1,15	1,23
1	0,84	1,36
1	1,36	1,18
1	1,61	0,90
1,5	1,08	1,16
1,5	1,09	1,89
1,5	1,08	1,95
2	0,96	0,44
2	0,91	1,64
2	1,82	1,06
3	0,10	0,63
3	0,61	1,63
3	1,29	0,69
4	0,07	0,46
4	0,30	1,28
4	0,88	1,28
6	0,35	0,83
6	0,55	0,86
6	0,79	0,91
24	0,56	0,19
24	0,47	0,41
24	0,50	0,79

Tableau 14. Valeurs d'adsorption du naphtalène (mgL^{-1}) sur *Burkholderia cepacia*

Temps (h)	Autoclavage	HgCl ₂
0	0 (0)	0 (0)
0,17	1,02 (0,29)	1,07 (0,82)
1	0,96 (0,44)	1,17 (0,55)
6	0,59 (0,57)	0,59 (0,39)
24	1,03 (0,06)	0,97 (0,31)

Annexe 9. Cinétiques de désorption du naphthalène pour des concentrations différentes en B34

Tableau 15. Cinétiques de désorption du naphthalène pour différentes concentrations en B34 (mgg^{-1})

Temps (h)	0,05gB34L ⁻¹	0,1gB34L ⁻¹	0,25gB34L ⁻¹	0,5gB34L ⁻¹	1gB34L ⁻¹
0	0	0	0	0	0
0,5	34,2	25,6	9,44	3,42	1,23
0,5	30,2	22	8,32	3,98	1,17
1	33,4	21,8	15,44	6,04	2,14
1	30,4	26,9	13,72	5,1	2,11
1,5	53	27	14,16	6,76	2,27
1,5	40,2	37,5	15,6	6,2	2,11
2	53,4	37,1	14,16	7,12	2,27
2	46,8	39,3	13,2	6,58	2,4
3	49,2	38,7	14,48	6,9	2,29
3	43,4	39,6	15,48	6,74	2,18
4	44,8	36,7	13,48	6,32	2,06
4	42,6	36,6	15,08	6,4	1,98
6	36,8	34,6	12,6	6,36	1,93
6	34,4	32,7	14,04	5,94	1,9
8	33,8	32,6	11,04	5,78	2,09
8	32,8	32,8	12,2	5,62	2,11

Annexe 10. Isothermes d'adsorption et de désorption du naphthalène sur B34 et le sédiment de rivière

Tableau 16. Valeurs d'isothermes d'adsorption du naphthalène sur le complexe montmorillonite/polyacrylamide

Naphtalène en solution (mgL^{-1})	Naphtalène adsorbé (mgg^{-1})
0	0
11,68	1
11,79	0,2
11,89	0,16
11	0,64
17,88	0,6
18,65	0,2
22	0,94
29	1,08

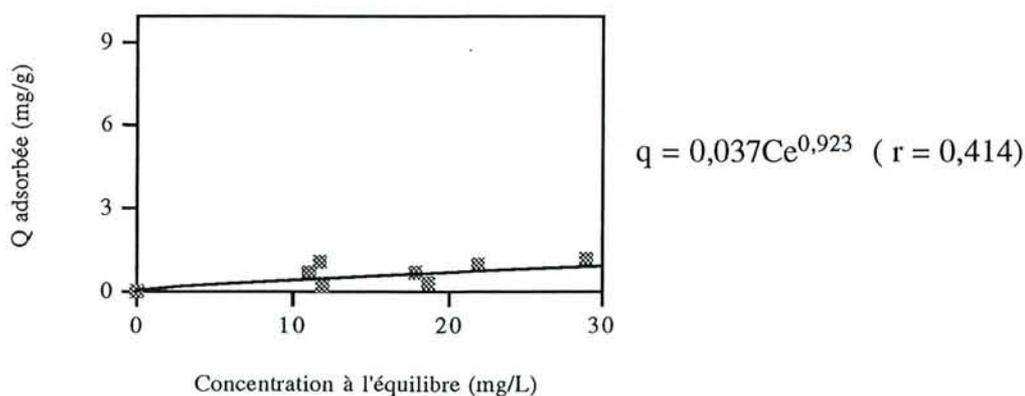


Figure 3. Isotherme d'adsorption du naphthalène sur le complexe - Ajustement à un modèle de Freundlich

Tableau 17. Valeurs d'isothermes d'adsorption et de désorption du naphtalène sur B34

Solution (mgL ⁻¹)	Adsorbé (mgg ⁻¹)	1/ solution (Lmg ⁻¹)	1/ adsorbé (gmg ⁻¹)	Solution désorbé (mgL ⁻¹)	Adsorbé (mgL ⁻¹)
0,00	0,00			1,26	10,7
0,935	8,24	1,00	0,1120	1,24	10,7
1,51	9,55	0,662	0,1020	1,17	10,7
1,60	13,0	0,625	0,0760	1,48	13,6
1,75	7,80	0,571	0,1280	1,52	13,5
1,77	14,6	0,546	0,0683	1,23	10,4
1,78	14,7	0,562	0,0679	2,19	17,1
1,84	8,96	0,543	0,1120	2,45	16,5
1,86	11,2	0,538	0,0891	2,59	24,1
1,86	12,7	0,538	0,0784	3,16	21,8
1,91	10,6	0,524	0,0948	1,71	19,5
2,21	19,4	0,422	0,0517	2,52	18,2
2,40	15,9	0,417	0,0627	3,12	15,8
2,40	20,2	0,417	0,0627	1,99	18,6
2,47	11,9	0,405	0,0841	3,15	30,4
2,67	16,6	0,375	0,0602	3,77	24,2
2,68	14,4	0,373	0,0694	2,08	27,7
2,75	20,6	0,364	0,0486	2,36	26,2
2,78	17,7	0,360	0,0566	3,93	29,2
2,84	11,3	0,352	0,0888	2,72	33,4
2,93	14,8	0,341	0,0675	4,16	29,1
3,13	22,6	0,319	0,0442	4,46	26,1
3,30	23,0	0,303	0,0436	2,20	34,3
3,38	26,6	0,296	0,0486	2,56	37,3
3,42	22,3	0,292	0,0448	3,82	30,0
3,44	25,8	0,291	0,0387	3,56	29,4
3,66	19,8	0,273	0,0505		
4,38	33,5	0,228	0,0299		
4,92	23,1	0,203	0,0433		
5,38	34,8	0,186	0,0288		
5,42	33,6	0,185	0,0298		
5,60	36,0	0,179	0,0278		
5,69	35,7	0,176	0,0280		
5,92	46,1	0,169	0,0217		
6,92	36,6	0,145	0,0273		
7,08	64,1	0,141	0,0154		
7,27	35,5	0,138	0,0282		
7,82	40,9	0,128	0,0244		
7,86	60,8	0,127	0,0164		
9,02	42,7	0,111	0,0234		
9,04	34,6	0,111	0,0289		
9,10	50,2	0,110	0,0199		
9,18	78,1	0,109	0,0128		
9,84	50,2	0,102	0,0199		
10,3	65,3	0,096	0,0153		
10,6	62,9	0,094	0,0159		
12,3	51,8	0,081	0,0193		
14,0	56,6	0,071	0,0177		
1,56	12,0	0,641	0,0835		
1,61	15,3	0,621	0,0654		
3,24	28,3	0,309	0,0353		
5,51	61,9	0,181	0,0162		
7,78	70,7	0,129	0,0141		

Tableau 18. Valeurs d'adsorption et de désorption du naphtalène à partir du sédiment

Adsorption		Désorption	
Solution (mgL ⁻¹)	Adsorbé (m μ g ⁻¹)	Solution désorbé (mgL ⁻¹)	Adsorbé (m μ g ⁻¹)
0	0	0	0,00
27,82	0,53	0,69	0,00
28,25	0,47	0,57	0,00
27,33	0,572	0,91	0,00
28,57	0,548	1,56	0,00
25,35	0,423	1,53	0,00
25,66	0,41	1,73	0,00
22,95	0,345	1,97	0,00
23,1	0,34	2,26	0,02
16,72	0,33	2,29	0,07
18,3	0,3	3,95	0,11
4,18	0,08	4	0,10
4,57	0,075	4,27	0,06
5,68	0,08	3,96	0,03
5,75	0,084	4,55	0,04
23,09	0,46	4,44	0,02
18,22	0,4	4,5	0,02
18,54	0,27	4,17	0,24
18,19	0,43		
18,88	0,13		
17,83	0,34		
17,58	0,43		
17,17	0,34		
17,02	0,37		
16,08	0,28		
16,97	0,19		
13,62	0,26		
12,8	0,312		
13,1	0,18		
12,82	0,19		
12,57	0,14		
12,03	0,15		
10,97	0,14		
11,03	0,14		
14,94	0,27		

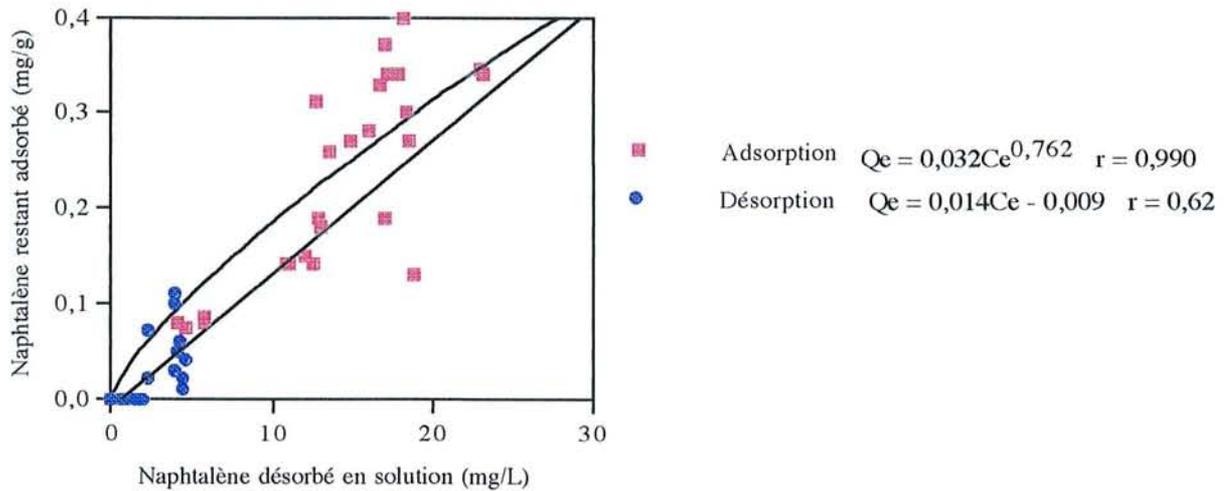
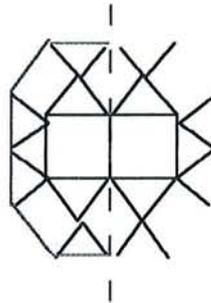


Figure 4. Isotherme d'adsorption et de désorption du naphthalène sur le sédiment

Annexe 11. Calcul de la surface maximale développée par le naphthalène

Les liaisons C-C pour les cycles aromatiques sont de 0,1395nm et les liaisons C-H valent 0,11nm (Handbook of Chemistry and Physics, 1990). Sur ces bases et en considérant le naphthalène comme 2 hexagones dont les côtés mesurent 0,1395nm, de 4 rectangles de 0,11 x 0,1395nm et de 14 triangles isocèles de 0,11nm (Figure 5), la surface maximale déployée par le naphthalène est approximée à 0,37958nm².

Figure 5. Schématisation du naphthalène en deux cycles benzzeniques



Annexe 12. Test d'adhésion à l'octane

Le test d'adhésion à l'octane est réalisé selon le protocole de caractérisation des souches bactériennes décrit au paragraphe 3.10.5.

Avec une DO initiale de 0,3, et des valeurs répertoriées dans le tableau 20, le pourcentage d'adhésion est de 31,4 (7,8)%

Tableau 19. Valeurs du test d'adhésion à l'octane

DO Témoin	DO Essai
0,296	0,212
0,296	0,224
0,296	0,173

Annexe 13. Biodégradation du naphthalène par *Burkholderia cepacia*

Tableau 20. Evolution de la concentration en naphthalène et de la quantité de microorganismes

Temps (h)	Témoin (mgL ⁻¹)	Naphtalène (mgL ⁻¹)	10 ⁶ UFCmL ⁻¹
0	18,12 (0,98)	18,31 (0,28)	2,3 (0,5)
6	16,2 (0,11)	14,66 (0,18)	4,0 (1,5)
12	15,23 (0,05)	1,7 (0,42)	15,2 (6,2)
18	14,63 (0,09)	0 (0)	30,5 (8,1)
24	14,27 (0,41)	0 (0)	32,1 (2,6)
30	13,54 (0,05)	0 (0)	33,6 (4,5)

Annexe 14. Biodégradation du naphthalène en présence montmorillonite sodiqueTableau 21. Evolution de la concentration en naphthalène (mgL⁻¹) avec et sans 0,5gL⁻¹ de montmorillonite

Temps (h)	Naphtalène		Témoins abiotiques	
	0gL ⁻¹	0,5gL ⁻¹	0gL ⁻¹	0,5gL ⁻¹
0	11,45 (0,29)	10,59 (0,04)	11,19 (0,14)	10,68 (0,14)
4	10,96 (0,26)	10,26 (0,03)	10,72 (0,14)	10,24 (0,11)
8	10,18 (0,22)	9,61 (0,05)	10,15 (0,14)	9,74 (0,15)
12	8,85 (0,38)	8,6 (0,14)	9,69 (0,13)	9,26 (0,15)
16,5	4,55 (0,45)	6,1 (0,21)	9,17 (0,11)	8,57 (0,02)
24	0 (0)	0,53 (0,38)	8,41 (0,40)	7,82 (0,19)
32	0 (0)	0 (0)	7,9 (0,45)	7,44 (0,12)

Tableau 22. Evolution de la concentration en naphthalène (mgL⁻¹) avec différentes concentrations de montmorillonite

Temps (h)	0gL ⁻¹	0,01gL ⁻¹	0,025gL ⁻¹ *	0,05gL ⁻¹	0,1gL ⁻¹	0,25gL ⁻¹	0,5gL ⁻¹	Témoin abiotique
2	33,1 (0,09)	33,42 (0,08)	32,53	32,6 (0)	32,64 (1,37)	33,59 (0,05)	33,53 (0,22)	33,05 (0,16)
4	31,45 (0,21)	32,45 (0,029)	30,87	31,5 (0,03)	31,47 (0,55)	32,48 (0,32)	32,76 (0,2)	33,45 (0,03)
6	29,19 (2,49)	30,44 (0,03)	28,59	29,21 (0,72)	29,97 (2,66)	32,38 (0,2)	32,64 (0,38)	32,61 (0,12)
8	25,33 (3,4)	26 (0,82)	24,64	25,59 (0,3)	25,9 (1,6)	31,47 (0,05)	32,46 (0,65)	32,54 (0,04)
10	19,73 (2,14)	22,18 (0,05)	18,8	22,12 (0,45)	22,82 (1,45)	28,6 (0,57)	32,25 (0,53)	32,77 (0,14)
12	15,24 (0)	16,4 (0,52)	15,03	18,48 (0,36)	19,45 (1,58)	24,51 (0,41)	28,82 (0,79)	31,38 (0)
18	10,31 (0,08)	11,11 (1,2)	9,45	12,24 (0,53)	12,3 (1,39)	16,22 (0,44)	19,35 (0,79)	27,71 (0,16)
27	7,74 (1,09)	6,6 (1,5)	5,61	9,54 (0,03)	9,38 (0,65)	12,63 (0,25)	13,71 (0,25)	24,44 (0,61)
34	6,03	5,53		8,06	8,04	10,12 (0,5)	11,35	21,67

* L'essai avec la concentration en montmorillonite de 0,025gL⁻¹ a été réalisé en simplicat

Tableau 23. Evolution de la concentration en microorganismes *Burkholderia cepacia* (UFC/mL) avec différentes concentrations de montmorillonite en début (X_0) et en fin d'expérience (X_f)

Montmorillonite (g L^{-1})	X_0 (10 6 UFCmL $^{-1}$)	X_f (t=34heures) (10 6 UFCmL $^{-1}$)
0	1,4 (0)	1,8 (0,1)
0,01	1,8 (0,11)	1,7 (0)
0,025*	1,82	1,7
0,05	1,66 (0,10)	1,9 (0,1)
0,1	1,85 (0,21)	2 (0,2)
0,25	2,05 (0,07)	2,2 (0,3)
0,5	2,05 (0,35)	2 (0,3)

* L'essai avec la concentration en montmorillonite de 0,025g L^{-1} a été réalisé en simplicat

Annexe 15. Biodégradation du naphthalène en présence de complexe montmorillonite/polyacrylamide

Tableau 24. Evolution de la concentration en naphthalène (mg L^{-1}) avec différentes concentrations de complexe

Temps (h)	Témoin	Concentration en complexe (g L^{-1})					
		0	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5
0	21,53 (0,73)	20,51 (0,28)	19,56 (0,31)	19,7 (0,19)	18,87 (0,39)	19,77 (0,59)	19,9 (0,28)
2	20,84 (0,13)	17,97 (0,08)	17,54 (0,6)	17,9 (0,06)	18,28 (0,32)	17,91 (0,98)	18,15 (0,02)
4	19,78 (0,15)	13,45 (2,25)	14,47 (0,44)	14,66 (0,02)	15,17 (0,10)	15 (0,65)	15,24 (0,22)
6	19,11 (0,75)	7,457 (1,87)	8,20 (0,22)	8,36 (0,07)	9,05 (0,44)	9,29 (0,87)	9,28 (0,26)
8	18,325 (0,49)	0,62 (0,02)	1,45 (0,07)	1,64 (0,20)	1,97 (0,18)	1,98 (0,20)	2,10 (0,29)
10	17,035 (0,66)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,09 (0,03)	0,04 (0,06)	0,16 (0,07)

Tableau 25. Evolution de la concentration en microorganismes *Burkholderia cepacia* (UFCmL $^{-1}$) avec différentes concentrations de complexe en début (X_0) et en fin d'expérience (X_f)

Complexe (g L^{-1})	X_0 (10 6 UFCmL $^{-1}$)	X_f (t=10h) (10 6 UFCmL $^{-1}$)
0	9,1 (0,7)	14,5 (0,7)
0,025	9,4 (1,3)	12,5 (0)
0,05	9,9 (1,5)	16,0 (1,4)
0,1	10,1 (0,1)	12,1 (0,1)
0,25	8,1 (3,3)	14,0 (1,06)
0,5	9,4 (0,5)	11,0 (3,1)

Tableau 26. Evolution de la concentration en naphthalène dans l'essai de biodégradation avec et sans polyacrylamide (PM=4400)

Temps (h)	Biodégradation		Témoins abiotiques	
	0gL ⁻¹ polyacrylamide	0,12gL ⁻¹ polyacrylamide	0gL ⁻¹ polyacrylamide	0,12gL ⁻¹ polyacrylamide
0	19,07 (0,13)	18,47 (0,72)	19,61 (0,52)	19,20 (0,26)
4	17,96 (0,18)	17,79 (0,24)	18,52 (0,24)	18,40 (0,24)
8	16,44 (0,24)	15,93 (0,39)	17,76 (0,23)	17,69 (0,28)
12	9,98 (1,36)	9,09 (0,86)	16,89 (0,23)	16,67 (0,33)
16	1,97 (0,82)	1,12 (0,67)	16,25 (0,20)	16,06 (0,40)
18	0,37 (0,19)	0,20 (0,07)	15,18 (0,16)	15,19 (0,29)
29	0 (0)	0 (0)	13,73 (0,14)	13,98 (0,47)

Annexe 16. Biodégradation du naphthalène en présence d'argile organique B34

Tableau 27. Evolution de la concentration de naphthalène (mgL⁻¹) soumis à biodégradation en fonction du temps en présence de différentes concentrations de B34

Temps (h)	Concentration en B34 (gL ⁻¹)					
	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
0	9,31 (0,1)	6,53 (0,18)	4,73 (0,07)	2,75 (0,22)	1,81 (0,05)	0,93 (0,02)
3	7,54 (0,21)	4,70 (0,36)	3,94 (0,15)	2,42 (0,11)	1,72 (0)	0,65 (0,02)
6	2,00 (0)	1,54 (0,16)	1,26 (0,28)	0,92 (0,02)	0,73 (0,06)	0,50 (0,04)
8	0,44 (0,51)	0,19 (0,07)	0,27 (0)	0,30 (0,03)	1,36 (0)	0,41 (0,07)
10	0 (0)	0,09 (0,12)	0,08 (0)	0,20 (0,03)	1,29 (0,02)	0,30 (0,24)
26	-	-	-	-	1,39 (0)	0,48 (0)

Tableau 28. Evolution de la concentration de naphthalène en solution (mgL⁻¹) des témoins en fonction du temps en présence de différentes concentrations de B34

Temps (h)	Concentration en B34 (gL ⁻¹)					
	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
0	9,76	6,93	4,83	3,00	1,81	0,95
3	9,32	6,18	4,50	2,63	1,72	0,92
6	8,98	5,97	4,41	2,41	0,73	0,56
8	7,47	5,72	4,23	2,45	1,36	0,41
10	7,38	5,89	4,00	2,30	1,29	0,59
26	-	-	-	-	1,39	0,78

Tableau 29. Evolution de la quantité de naphtalène adsorbé (mgg^{-1} de B34) en fonction du temps en présence de différentes concentrations de B34

Temps (h)	Concentration en B34 (gL^{-1})				
	0,05	0,1	0,25	0,5	1
0	40,6 (3)	33,4 (1,7)	23,9 (1,32)	12,9 (0,88)	33,4 (1,7)
3	42 (0,6)	30,2 (6,1)	17,1 (2,2)	10,9 (0,64)	30,2 (6,1)
6	12,7 (1)	8,2 (0,8)	7,72 (0,76)	5,64 (0,3)	8,2 (0,8)
8	3 (0,8)	3,2 (0,4)	4,0 (0,56)	3,14 (0,54)	3,2 (0,4)
10	1,8 (0)	1,7 (0,3)	1,8 (1,08)	3,16 (0,12)	1,7 (0,3)
26	-	-	-	0,2 (0)	-

Tableau 30. Evolution de la quantité totale de naphtalène (adsorbé + solution) (mg de naphtalène dans l'essai) en fonction du temps en présence de différentes concentrations de B34

Temps (h)	Concentration en B34 (gL^{-1})					
	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1
0	0,931 (0,01)	0,956 (0,016)	0,807 (0,012)	0,873 (0,027)	0,826 (0,02)	0,929 (0,04)
3	0,754 (0,021)	0,68 (0,025)	0,696 (0,042)	0,671 (0,034)	0,686 (0,016)	0,628 (0,03)
6	0,2 (0)	0,2175 (0,012)	0,308 (0,025)	0,285 (0,012)	0,358 (0,011)	0,575 (0,02)
8	0,044 (0,051)	0,036 (0,006)	0,059 (0,003)	0,131 (0,01)	0,191 (0,013)	0,481 (0,03)
10	0 (0)	0,018 (0,01)	0,025 (0,002)	0,065 (0,016)	0,187 (0,005)	0,383 (0,015)
26	-	-	-	-	0,01 (0)	0,209 (0)

Tableau 31. Evolution de la quantité de naphtalène adsorbé (mgg^{-1}) et de la concentration en solution (mgL^{-1}) pour deux concentrations initiales en naphtalène et pour $0,1\text{gL}^{-1}$ de B34

Temps (h)	Naphtalène en solution (mgL^{-1})				Naphtalène adsorbé (mgg^{-1})
	Témoin abiotique	0gL^{-1} de B34	0gL^{-1} de B34	$0,1\text{gL}^{-1}$ de B34	
0	15,66	14,21 (0,95)	8,44 (0)	7,08 (0,92)	66,8 (9,2)
2	15,32	13,5 (0,24)	7,88 (0,08)	6,5 (1,28)	74,4 (12,8)
4	15,85	12,78 (0,75)	7,35 (0,1)	6,05 (0,68)	73,4 (6,8)
6	15,22	8,72 (1,55)	3,77 (0,31)	4,74 (1,09)	55,8 (10,9)
8	13,71	6,15 (0,06)	0,8 (0,3)	2,35 (0,8)	35,8 (8,0)
10	13,82	1,35 (0,68)	0 (0)	0,9 (0,28)	13,1 (2,8)
12	13,13	0,12 (0,05)	0 (0)	0,14 (0,13)	3,6 (1,3)

Tableau 32. Evolution de la quantité totale de naphthalène (adsorbé + solution) en mg avec 0,1gL⁻¹ de B34 et sans B34 pour une même concentration initiale

Temps (h)	0gL ⁻¹ de B34	0,1gL ⁻¹ de B34
0	1,42 (0,095)	1,37 (0,092)
2	1,35 (0,024)	1,39 (0,128)
4	1,27 (0,075)	1,33 (0,068)
6	0,87 (0,155)	1,03 (0,109)
8	0,61 (0,006)	0,62 (0,08)
10	0,13 (0,068)	0,22 (0,028)
12	0,01 (0,005)	0,05 (0,013)

Annexe 17. Biodégradation du naphthalène en présence de sédiment

Tableau 33. Evolution de la concentration de naphthalène en solution (mgL⁻¹) en présence de différentes quantités de sédiments

Temps (h)	0gL ⁻¹ B34	0,5gL ⁻¹	5gL ⁻¹	10gL ⁻¹	25gL ⁻¹	50gL ⁻¹
0	28,45 (0,16)	28,67	24,92	23,8	18,62	14,94 (0,45)
	26	(0,13)	(0,29)	(0,15)	(0,27)	11,83 (0,38)
3	(0,14)	26,4	22,98	21,88 (0,26)	17,32	4,68
	23,1	(0,33)	(0,55)	14,91 (0,31)	(0,32)	(0)
6	(0,04)	23,65	18,2	0,53	8,18	0,35
	18,78	(0,37)	(0,66)	(0,11)	(0,33)	(0,27)
8,5	(0,60)	19,7	7,25	0,24	0,155	0
	15,24	(0,39)	(1,56)	(0,21)	(0,21)	(0)
10	(0,46)	16,2	0,77	0	0	0
	9,53	(0,7)	(0,06)	(0)	(0)	(0)
12	(0,26)	11,41	0	0	0	0
	5,38	(1,82)	(0)	(0)	(0)	(0)
14	(0,77)	7,8	0	-	0	-
	0,65	(2,11)	(0)	-	(0)	-
16	(0,09)	2,53	-	-	-	-
		(0,806)	-	-	-	-

Tableau 34. Evolution de la concentration de naphthalène en solution (mgL⁻¹) dans les témoins en présence de différentes quantités de sédiments

Temps (h)	0gL ⁻¹ B34	0,5gL ⁻¹	5gL ⁻¹	10gL ⁻¹	25gL ⁻¹	50gL ⁻¹
0	31,26	30,94	27,42	25,07	19,47	16,38
3	29,27	29,18	26,34	23,07	18,56	13,69
6	28,65	27,48	25,12	21,96	17,78	12,96
8,5	27,47	26,47	23,59	21,78	16,09	12,56
10	27,75	25,33	22,53	20,12	15,22	12,2
12	25,22	23,8	21,44	20,14	15,82	12,58
14	22,98	22,7	20,62	19,22	14,74	11,7
16	21,12	20,9				

Tableau 35. Evolution des microorganismes en fonction du temps : *Burkholderia cepacia* et microorganismes autochtones

Sédiment (gL ⁻¹)	Nombre de microorganismes poussant sur gélose (10 ⁶ UFCmL ⁻¹)							
	t = 0		t = 9h		t = 12h		t = 16h	
0	0,83 (0,20)	0	0,86 (0,25)	0	0,74 (0,33)	0	0,45 (0,39)	0
0,5	1,03 (0,24)	0	0,74 (0,19)	0	0,45 (0,06)	0	0,56 (0,06)	0
5	0,85 (0,17)	0,11	0,74 (0,19)	0	0,81 (0,22)	0	0,79 (0,36)	0
10	1,023 (0,45)	0	1,10 (0,28)	0,06(0,01)	1,28 (0,12)	0	0,91 (0,46)	0
25	1,59 (0,7)	0,09(0,02)	1,93 (0,49)	0,39(0,18)	1,96 (0,42)	0,15(0,07)	nc	0,3(0,03)
50	1,22(0,06)	0,31(0,04)	1,5 (0,17)	0,41(0,17)	nc	0,55(0,35)	nc	0,44(0,3)

En italique est donnée la concentration des microorganismes autres que *Burkholderia cepacia*
nc : non comptable par gène des microorganismes autochtones

Il est aisé de reconnaître *Burkholderia cepacia* parmi les microorganismes du sédiment poussant sur gélose nutritive. En effet, ce sont de petites colonies rondes et blanches. La lecture des colonies sur gélose est effectuée à t = 96heures.

Annexe 18. Granulométrie des particules de complexe, de sédiment et de *Burkholderia cepacia*

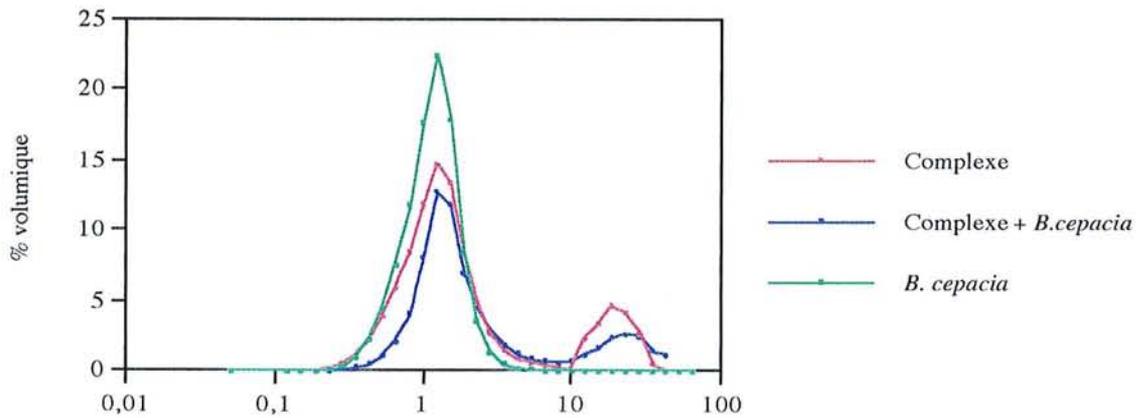


Figure 6. Granulométrie des particules de complexe montmorillonite/polyacrylamide, de *Burkholderia cepacia* et du mélange

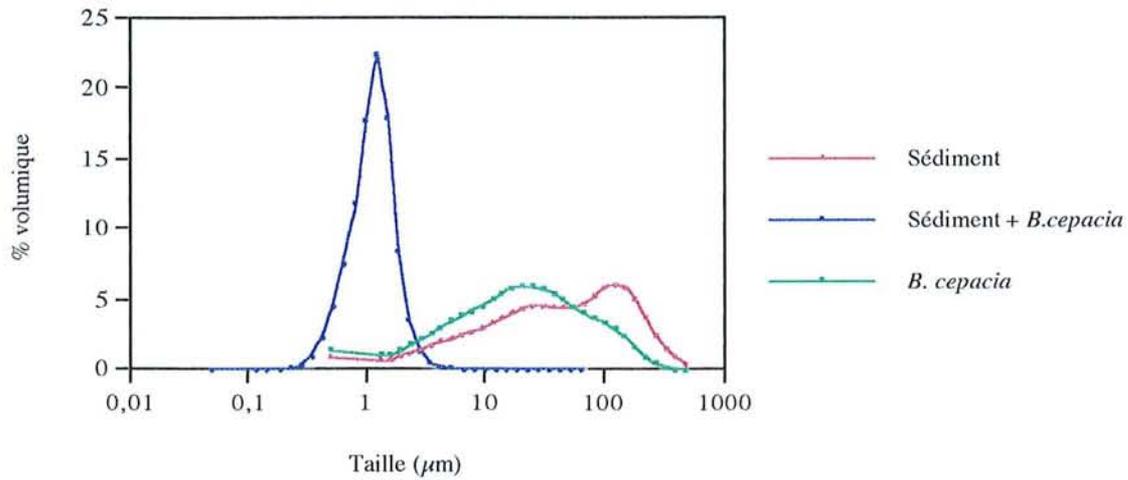


Figure 7. Granulométrie des particules de sédiment, de *Burkholderia cepacia* et du mélange

Annexe 19. Spectres de surface d'une suspension de montmorillonite et d'une suspension de montmorillonite + *Burkholderia cepacia* déposées sur un filtre Millipore

Annexe 20. Biodégradation du naphthalène dans une suspension de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite à différentes vitesses d'agitation des barreaux magnétiques

Tableau 36. Evolution de la concentration en naphthalène (mgL^{-1}) en solution dans les témoins abiotiques et dans les essais de biodégradation en fonction de la vitesse de rotation des barreaux magnétiques

Temps (h)	Témoins abiotiques			Essais de biodégradation		
	0rpm	250rpm	500rpm	0rpm	250rpm	500rpm
0	32,46 (1,14)	32,29 (0,18)	33,77 (0,26)	29,17 (1,07)	29,19 (0,84)	29,48 (0,87)
2	31,71 (0,88)	31,08 (1,72)	31,94 (0,11)	26,98 (1,27)	26,97 (0,79)	27,31 (0,91)
4	30,39 (0,60)	30,18 (0,28)	31,26 (0,66)	24,84 (1,21)	24,77 (0,38)	25,13 (0,98)
7	28,89 (0,22)	28,11 (0,26)	28,88 (0,20)	19,26 (0,25)	19,64 (0,46)	19,31 (0,30)
9,5	28,23 (1,28)	27,20 (0,02)	28,96 (0,48)	10,74 (1,76)	11,3 (0,65)	10,66 (0,64)
12	26,17 (0,34)	26,05 (0,48)	26,21 (0,28)	0,22 (0,08)	0,3 (0,02)	0,23 (0,04)

Annexe 21. Transfert du naphthalène à travers une membrane en présence et en l'absence de 0,5gL⁻¹ de montmorillonite

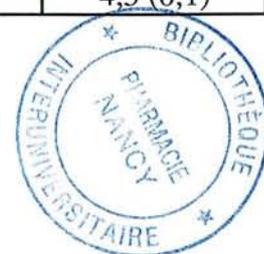
Tableau 37. Concentrations de naphthalène (mgL⁻¹) transférées à travers la membrane en fonction du temps

Temps (h)	0gL ⁻¹ montmorillonite		0,5gL ⁻¹ de montmorillonite	
	Essai 1	Essai 2	Essai 1	Essai 2
0,00	0,00	0,00	0	0
0,75	0,09	-	-	-
1,00	0,10	0,00	0	-
1,50	0,19	0,26	-	0
2,00	0,32	0,32	-	-
2,50	0,41	0,41	-	0
3,00	0,45	0,46	0,05	-
3,50	-	-	0,1	-
4,00	0,66	0,64	0,13	-
4,50	-	0,71	-	0,09
5,00	-	0,78	0,19	-
5,50	-	0,89	0,21	0,13
6,00	-	1,03	0,21	-
6,5	-	-	-	0,17
7,25	-	-	0,24	-
7,5	-	-	-	0,18
8,5	-	-	-	0,21
8,75	-	-	0,29	-
10	-	-	-	0,29

Annexe 22. Biodégradation du naphthalène dans un milieu minéral et dans un surnageant de montmorillonite par *Burkholderia cepacia*

Tableau 38. Evolution de la concentration en naphthalène et bactérienne dans un milieu minéral et dans un surnageant de montmorillonite lors de la biodégradation par *Burkholderia cepacia*

Temps (h)	Naphthalène (mgL ⁻¹)			<i>Burkholderia cepacia</i> (10 ⁷ UFCmL ⁻¹)	
	Témoin	Milieu minéral	Surnageant	Milieu minéral	Surnageant
0	20,68	19,93 (0,59)	20,72 (0,33)	2,9 (1,6)	2,2 (1,5)
2,5	19,70	19,48 (0,02)	22,08 (1,06)	(5,7 (0,4)	(4,4 (0,1)
5	19,57	17,49 (0,50)	19,70 (1,12)	3,4 (1,7)	3,7 (0,7)
6,5	17,39	16,15 (0,23)	17,98 (0,79)	4,8 (0,8)	4,6 (1,6)
8	16,73	15,53 (0,10)	17,30 (1,06)	5,0 (0,2)	4,0 (0,6)
10	16,06	13,92 (0,29)	14,53 (0,85)	-	-
12	14,67	12,03 (0,59)	10,49 (0,75)	5,0 (0)	3,7 (1,1)
15,75	13,74	1,04 (0,35)	7,64 (0,65)	-	-
20	13,01	0 (0)	4,68 (0,58)	3,7 (0,5)	4,5 (0,1)



Nom, Prénom : M A G D A L I N I U K Sandrine

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en BIOLOGIE ET SANTE

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 20 NOV. 1995 n° 449

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



Résumé

L'objectif de ce travail de recherche vise à déterminer les paramètres limitant la biodisponibilité d'un polluant organique, le naphthalène ($S=30\text{mgL}^{-1}$ à 25°C , $\log K_{ow}=3,3$) en présence de particules solides en suspension, de façon à évaluer son devenir et sa persistance dans les hydrosystèmes.

Quatre matériaux solides, choisis pour leur différente capacité de rétention du naphthalène, ont été employés pour les essais de biodégradation de l'hydrocarbure : un matériau hydrophile, la montmorillonite sodique, n'adsorbant pas le naphthalène (coefficient de partage $K_p=0\text{mLg}^{-1}$), deux matériaux présentant des capacités de rétention proches, un complexe montmorillonite/polyacrylamide ($K_p=40\text{mLg}^{-1}$) et un sédiment naturel de rivière ($K_p=20\text{mLg}^{-1}$) et enfin un support possédant une forte affinité pour le naphthalène, l'argile organique B34 ($K_p=5920\text{mLg}^{-1}$). Différents comportements du naphthalène face à la biodégradation par *Burkholderia cepacia* sont observés en fonction du type de matériau utilisé.

La faible modification, non significative, des cinétiques de biodégradation en présence de complexe montmorillonite/polyacrylamide (peu adsorbant), est expliquée par des concentrations de solide en suspension employées trop faibles ($< 0,5\text{gL}^{-1}$).

En présence de sédiment naturel (jusqu'à 50gL^{-1}), les quantités de naphthalène en solution biodégradé ainsi que les cinétiques sont augmentées. Ces modifications seraient dues à un apport complémentaire de carbone organique biodégradable et de microorganismes par le sédiment.

Par contre, les cinétiques de biodégradation en présence de $0,5\text{gL}^{-1}$ de montmorillonite (support non adsorbant du naphthalène) et de $0,5\text{gL}^{-1}$ de B34 (support fortement adsorbant du naphthalène) sont presque réduites d'un facteur voisin 3. Les essais prouvent que ni le transfert de masse externe, ni le transfert de masse interne ne sont responsables de la limitation de la biodisponibilité du naphthalène. La montmorillonite est une argile qui a la capacité de retenir les éléments minéraux initialement présents dans le milieu, les rendant ainsi limitant pour la biodégradation et expliquant la réduction des cinétiques. La sorption du naphthalène par l'argile organique B34, réduisant ainsi les concentrations en solution est responsable de la limitation de la biodisponibilité du naphthalène. En conclusion, la modification des cinétiques de biodégradation dans l'environnement est non seulement lié à sa biodisponibilité mais également à la biodisponibilité d'autres éléments minéraux.

Mots clés : Biodégradation, Biodisponibilité, Naphthalène, Sorption, Argile

Abstract

The principle aim of this work is to determine the parameters limiting the bioavailability of organic compounds in the environment. For this study, we used naphthalene, a poorly soluble polycyclic aromatic hydrocarbon as model of organic compound. The biodegradation of naphthalene by *Burkholderia cepacia* was studied in the presence of different clay particles in suspension : Na-montmorillonite which does not retain naphthalene ($K_p=0\text{mLg}^{-1}$), two materials with narrow retention capacity, montmorillonite/polyacrylamide complex ($K_p=40\text{mLg}^{-1}$) and a river sediment ($K_p=20\text{mLg}^{-1}$), and an organo-clay which sorbes naphthalene in high quantities ($K_p=5920\text{mLg}^{-1}$).

Only a slight and non significant modification of the biodegradation rate of naphthalene are observed in the presence of the complex maybe due to the small concentration of particles ($< 0,5\text{gL}^{-1}$).

With the sediment, the quantities of biodegraded naphthalene and the biodegradation rates are increased, explained by the biodegradable organic carbon and the indigenous microorganisms carried out by the sediment.

However, the presence of $0,5\text{gL}^{-1}$ montmorillonite (non sorbant) and $0,5\text{gL}^{-1}$ of B34 (high sorbant) decreases by a factor about 3 the biodegradation rates. Several experimentations show that neither external mass transfer, neither internal mass transfer are responsible for the reduction of bioavailability of naphthalene. By its high cationic exchange capacity, Na-montmorillonite retain oligoelements, limiting their bioavailability. Naphthalene sorption by organo clay B34 is responsible for the decrease of its concentration in solution, explaining the slower biodegradation kinetics.

In conclusion, the modification of the biodegradation kinetics are related to the bioavailability of the compound and also of the bioavailability of other mineral compounds.

Key words : Biodegradation, Bioavailability, Naphthalene, Sorption, Clay