



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>



UFR Sciences et Techniques de la matière et des procédés
Ecole Doctorale RP2E
Spécialité Géosciences

Thèse

Présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I

Pierre LEGLIZE

Etudes des interactions Bactéries – Phénanthrène – Charbon Actif en vue de l'élaboration d'une Barrière Perméable Réactive

Soutenance publique prévue le 20 Décembre 2004

Membres du Jury

M. Barriuso Enrique	Directeur de Recherche, INRA Paris Grignon	Rapporteur
M. Albrecht Pierre	Directeur de Recherche, CNRS Strasbourg	Rapporteur
M. Block Jean Claude	Professeur, UHP, Nancy	Examineur
Mme Leyval Corinne	Directeur de recherche, CNRS, Nancy	Directeur de thèse
M. Berthelin Jacques	Directeur de recherche, CNRS, Nancy	Directeur de thèse
Mme Bajeat Petra	Ingénieur, ADEME, Angers	Invité
M. Saada Alain	Ingénieur, BRGM, Orléans	Invité



U.N.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHEQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

Pour Céline et Matthieu

Remerciements

Comment, en quelques lignes, remercier toutes ces personnes qui m'ont soutenu pendant ces cinq années passées au Limos. Je commencerais tout d'abord par remercier Corinne Leyval et Jacques Berthelin qui m'ont accordé leur confiance et sans qui je n'aurais pas pu mener à bien ce travail. Je remercie également les autres membres du jury, Enrique Barriuso, Pierre Albrecht et Jean Claude Block pour avoir accepté de juger mon travail. Enfin je tiens à remercier les deux organismes l'ADEME et le BRGM ainsi que leurs représentants Petra Bajeat et Alain Saada pour leur soutien.

Ces cinq années nancéennes m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes qui ont élargi ma vision du monde sur le plan scientifique et personnel. Tout d'abord, l'ensemble des personnes du Limos (l'équipe géomicrobiologie de l'ex-CPB) qui ont contribué de près ou de loin à mon travail, merci pour leur motivation et leurs aides, Thierry, Christian, Denis, Colette, Jojo et Christine, Anne, Nadim, Gilbert, Stéphanie, Michel, Jean Pierre, François, Françoise, Dominique, Chanchan. Merci également au breton Steven et à Najat pour m'avoir mis sur les chemins de la recherche. Encore merci à tous les autres compères de travail rencontrés au cours du DEA et de la thèse. Je pense à Stéphane, à Zaz et Samira, à Nico, Judi, Céline, Marie Paule, Manu, Gégé, Seb, Khadria et Ahmed, Sylvie, Roberto, Jeanne, Erik, Ouafae, Estelle

Enfin je voudrais remercier ma famille, mes parents et mon frangin pour leur soutien. Je terminerais embrassant mon épouse Céline et mon p'tit bout Matthieu qui m'ont supporté et m'ont apporté tout leur Amour durant ces années, sans eux deux ma vie ne serait rien.

1 Pollution des sols par les Hydrocarbures

Aromatiques Polycycliques (HAP) : Etat de l'art _____ 5

1.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) _____ 5

1.1.1 Origines _____ 5

1.1.2 Propriétés _____ 6

1.1.3 Toxicité _____ 8

1.2 Devenir des HAP dans les sols _____ 10

1.2.1 Transport des HAP dans les sols et les eaux souterraines _____ 10

1.2.2 Adsorption des HAP sur la phase solide _____ 12

1.2.3 Biodégradation des HAP dans les sols _____ 13

1.2.3.1 Dégradation par voie bactérienne _____ 15

1.2.3.2 Dégradation par voie fongique _____ 18

1.2.3.3 Facteurs intervenant dans les mécanismes de biodégradation _____ 18

1.3 Traitement des sols et des eaux souterraines contaminées par des HAP _____ 22

1.3.1 Critères de choix et procédés de dépollution _____ 22

1.3.2 Les Barrières Perméables Réactives (BPR) _____ 24

1.3.2.1 Principe _____ 24

1.3.2.2 Application à la pollution par des HAP _____ 25

Orientation et objectifs de l'étude _____ 27

2 Matériels et méthodes _____ 30

2.1 Matériels _____ 30

2.1.1 Matériaux testés _____ 30

2.1.2 Souches bactériennes : origines et isolement _____ 30

2.1.3 Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) _____ 31

2.2 Méthodes _____ 32

2.2.1 Culture bactérienne et méthodes de dénombrement _____ 32

2.2.2 Identification des souches bactériennes _____ 33

2.2.2 Essais d'adsorption _____ 35

2.2.2.1 Isotherme d'adsorption et de désorption du phénanthrène sur les matériaux
testés _____ 35

2.2.2.2 Isothermes d'adsorption bactérienne sur le charbon actif	36
2.2.3 Biodégradation du phénanthrène : essais en batch	38
2.2.3.1 Essais réalisés avec du phénanthrène marqué	38
2.2.3.2 Essais réalisés avec du phénanthrène non marqué	39
2.2.4 Essais en colonne	40
2.2.4.1 Préparation des colonnes	40
2.2.4.2 Principe des expériences en colonnes	41
2.3 Analyses	44
2.3.1 Caractérisation de la structure des matériaux	44
2.3.1.1 Mesures de surfaces spécifiques	44
2.3.1.2 Mesures de porosimétrie au mercure	45
2.3.2 Analyses organiques	46
2.3.2.1 Extraction liquide/liquide	46
2.3.2.2 Extraction du phénanthrène par ASE	46
2.3.2.3 Dosage du phénanthrène par HPLC	46
2.3.2.4 Dosage du phénanthrène par GC-FID	47
2.3.3 Caractérisation des propriétés des membranes bactériennes	47
2.3.3.1 Adhésion microbienne sur un hydrocarbure (test MATH)	47
2.3.3.2 Titrage potentiométrique acido-basique (TPH)	48
2.3.3.3 Potentiel électrocinétique	51
2.3.4 Observations en microscopie confocale	52
2.3.5 Analyses statistiques	53
3 Résultats discussion	55
3.1 Identification des souches et caractérisation des matériaux présélectionnés	55
3.1.1 Identification des souches bactériennes	55
3.1.2 Caractérisation des matériaux	56
3.1.2.1 Surface spécifique	56
3.1.2.2 Distribution des tailles et volumes de pores	56
3.1.3 Conclusion du chapitre	59
3.2 Etudes des phénomènes de sorption et de biodégradation du phénanthrène sur les matériaux présélectionnés	60
3.2.1 Cinétique d'adsorption du phénanthrène	60

3.2.2 Isotherme d'adsorption et de désorption du phénanthrène	61
3.2.3 Effet du support sur la biodégradation du phénanthrène	65
3.2.4 Conclusion du chapitre	70
3.3 Adsorption des bactéries sur le charbon actif : effet du phénanthrène et caractérisation des propriétés de surface	71
3.3.1 Adsorption de différentes souches bactériennes sur le charbon actif et effet du phénanthrène	71
3.3.2 Caractérisation des propriétés des membranes bactériennes	75
3.3.2.1 Affinité vis-à-vis d'une surface hydrophobe (test MATH)	76
3.3.2.2 Mesures des potentiels électrocinétiques	77
3.3.2.3 Propriétés électrochimiques des surfaces étudiées	80
3.3.3 Conclusion du chapitre	85
3.4 Effet de l'inoculum bactérien sur la biodégradation du phénanthrène	86
3.4.1 Effet de la souche bactérienne	86
3.4.2 Effet de la production de biopolymères sur la biodégradation de PHE	91
3.4.3 Conclusion du chapitre	96
3.5 Adsorption et biodégradation du phénanthrène dans un système dynamique	97
3.5.1 Adsorption du phénanthrène	97
3.5.2 Effet de l'inoculum bactérien sur le devenir du phénanthrène	101
3.5.3 Devenir de l'inoculum bactérien au sein d'un système dynamique	104
3.5.4 Conclusion du chapitre	108
4 Discussion générale et perspectives	110
4.1 Choix du matériau réactif	111
4.2 Effet des souches bactériennes sur la biodégradation du phénanthrène	112
4.3 Caractérisation des propriétés de surface et formation d'un biofilm	116
4.4 Essais à différentes échelles et perspectives	118
4.5 Conclusion	121
BIBLIOGRAPHIE	122
<i>Annexe</i>	<i>133</i>

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY

***Pollution des sols par les
Hydrocarbures Aromatiques
Polycycliques (HAP) : Etat de l'art***

1 Pollution des sols par les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) : Etat de l'art

Depuis le début du XX^{ème} siècle, la consommation de carburant fossile (charbon, pétrole) a considérablement augmenté, en particulier dans les pays industrialisés. L'usage de ces carburants est généralisé, du particulier jusqu'à l'industriel. Cette généralisation entraîne une multiplication des sources de contamination du milieu naturel. Cette contamination peut être ponctuelle par exemple au niveau d'un site de stockage, ou diffuse le long des infrastructures routières ou ferroviaires (Cathelain et al. 1981).

Le traitement des sols et des eaux souterraines contaminés par des hydrocarbures, en particulier les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) constitue un thème prioritaire des différents acteurs intervenant sur la problématique des sites et sols pollués. Par rapport aux différents traitements possibles, le développement de techniques *in situ* constitue une voie de recherche importante car ces techniques présentent certains avantages techniques et économiques. Dans cette optique, l'étude présentée sur les interactions bactéries-HAP-charbon actif a été soutenue par l'ADEME et le BRGM en vue de l'élaboration d'une méthode de traitement de type Barrière Perméable Réactive appliquée à la pollution par les HAP.

1.1 Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

1.1.1 Origines

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des molécules organiques neutres composées d'au moins deux cycles benzéniques et constituées uniquement de carbone et d'hydrogène. La formation des HAP peut être naturelle ou liée à une activité anthropique. Ils sont principalement issus de la combustion incomplète de carburant fossile. Naturellement, ils peuvent se former au cours d'un feu de forêt ou suite à une activité volcanique. Ils sont également présents au sein des gisements de carburants. En effet, la formation de pétrole induit la production d'un mélange complexe de HAP. Cependant, la principale source est d'origine anthropique. La dispersion de ces composés dans le milieu naturel peut se faire de

manière chronique via l'activité industrielle, le transport ou le chauffage, mais également de manière ponctuelle. En effet, dans la pétrochimie, de nombreux procédés sont à l'origine de la formation de HAP : extraction et raffinage du pétrole, cokéfaction. Ces activités industrielles se traduisent, sur les sites de productions, par la présence de nombreuses zones de stockages d'hydrocarbures, de goudrons ou de bitumes qui constituent des sources de contamination importantes (Colin 2000).

En France, la base de données BASOL (<http://www.environnement.gouv.fr/basol>) recense 3735 sites potentiellement contaminés. Une pollution des sols et/ou d'une nappe souterraine est constatée dans 2545 cas dont 16% sont contaminés par des HAP. En région Lorraine, 61 sites sont contaminés par des HAP. Parmi ceux-ci, 30 sont en cours d'évaluation ou de traitement, 26 ont été traités dont 21 avec des restrictions d'usage et 5 sont en activité et font l'objet d'un diagnostic. Cet inventaire ne prend pas en compte les pollutions accidentelles, diffuses et les éventuelles contaminations via des installations militaires ou privées.

Les informations disponibles sur les pollutions localisées par des hydrocarbures concernent uniquement les activités industrielles relevant de la législation sur les ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement). Les pollutions accidentelles (hors d'un site industriel), diffuses ou situées sur des sites militaires ne sont pas prises en compte. Au niveau des sites répertoriés les zones de contaminations sont en majorité des sols ou des nappes pollués par des retombées, des infiltrations, des épandages de substances polluantes ou des anciennes décharges de déchets industriels spéciaux. Les filières concernées sont :

- ↳ L'industrie pétrolière au niveau des différentes étapes du traitement du pétrole : extraction, raffinage, pétrochimie, transport et stockage
- ↳ L'industrie du charbon en particulier la fabrication du coke dont un des sous-produits, le goudron est une source importante de HAP.

1.1.2 Propriétés

Au niveau physico-chimique, les HAP se caractérisent par une forte hydrophobicité. Ceci se traduit par un coefficient de partage octanol/eau élevé (Kow) et inversement

proportionnel au nombre de cycles benzéniques (Haeseler *et al.* 1998). Les mécanismes de volatilisation des HAP ne sont significatifs que pour les composés ayant 2 ou 3 cycles. En effet, les HAP à 4 cycles et plus ont des constantes de tension de vapeur extrêmement faibles (Tableau 1).

Ces caractéristiques influencent leur dispersion dans l'environnement. Leur faible hydrosolubilité induit une présence limitée dans les solutions du sol. Leur caractère hydrophobe se traduit également par une tendance forte à se fixer sur les phases solides du sol présentant des surfaces hydrophobes, telles que les matières organiques naturelles ou anthropiques (Weissenfels *et al.* 1992). La mesure du Kow constitue un outil prédictif de la capacité d'adsorption d'un HAP sur ces surfaces (Fu *et al.* 1994).

Au niveau du transfert de ces composés vers les organismes vivants, leur forte hydrophobicité induit une bioaccumulation importante au niveau des tissus adipeux. Ceci implique des risques de bioconcentration tout au long de la chaîne alimentaire.






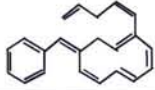
Composé	Structure chimique	Nombre de cycles	Log Kow	Solubilité dans l'eau mgL ⁻¹ à 25°C	Tension de vapeur mPa à 25°C
Naphtalène		2	3,37	31,7	11900
Anthracène		3	4,45	0,073	25
Phénanthrène		3	4,46	1,29	90,7
Pyrène		4	5,32	0,135	91,3*10 ⁻⁶
Benzo-a-pyrène		5	6,04	0,0038	0,37*10 ⁻⁶
Indéno-1,2,3-c,d-pyrène		6	7,23	0,062	1,6*10 ⁻⁵

Tableau 1. Propriétés chimiques et physiques de certains HAP (d'après Scherer *et al.*, 2000)

1.1.3 Toxicité

Les HAP sont des polluants organiques présentant des caractères de toxicité aiguë et de génotoxicité. Ce caractère toxique intrinsèque est dû à leur structure chimique et leur poids moléculaire élevé. L'agence américaine de protection de l'environnement (EPA 1998) préconise le suivi en priorité de 16 HAP ayant 2 à 6 cycles.

Ces molécules sont relativement stables chimiquement, leur élimination directe par un organisme vivant est donc limitée. Leur métabolisation se fait par l'incorporation de groupements chimiques polaires (hydroxyles, carboxyles) qui augmente leur hydrosolubilité et facilite leur élimination par les urines ou le système biliaire. Cependant, les métabolites produits sont souvent plus toxiques que la molécule-mère, et on parle d'activation métabolique (Gram 1995). Le caractère génotoxique des HAP est avéré pour les composés de poids moléculaire élevé, possédant plus de 4 cycles aromatiques comme le benzo(a)pyrène. Sa métabolisation par des cellules eucaryotes s'effectue au niveau hépatique en deux phases : oxydation par le cytochrome P-450 avec formation d'époxyde, de dihydrodiol puis de diol époxydes et transformation en tétrols. Ces structures chimiques sont capables de se lier de manière covalente à des protéines et à l'ADN sous forme d'adduits. Ces adduits, s'ils ne sont pas réparés, constituent des initiateurs de la cancérogénèse. Les HAP de plus faible poids moléculaire comme le naphthalène (2 cycles) ou le phénanthrène (3 cycles) ne sont pas classés par l'Union Européenne parmi les composés cancérogènes. Cependant, ils présentent un danger de toxicité aiguë. L'exposition au naphthalène provoque des vomissements, diarrhées et le développement d'anémies hémolytiques. La Dose Minimale induisant un Effet Nocif Observé (DMENO ou LOAEL en anglais) a été fixée à 109 mg/kg/jour pour l'Homme. La toxicité du naphthalène serait due à la formation de quinones à partir du 1-naphtol plutôt qu'à la formation de l'époxyde (Wilson et al. 1996). Aucune donnée de toxicité aiguë n'est disponible pour le phénanthrène sur l'Homme. Une DL₅₀ (Dose Léthale pour 50% des individus) comprise entre 700 et 1000 mg.kg⁻¹ a été observée sur la souris. Pour ces deux composés, aucune donnée sur l'effet cancérogène chez l'Homme n'est disponible. Les tests réalisés sur l'animal montrent qu'une exposition au phénanthrène ou au naphthalène ne semble pas induire de tumeurs (Pichard 2000a, b, c). Le Tableau 2 regroupe certaines données écotoxicologiques disponibles pour le naphthalène (NAPH), le phénanthrène (PHE) et le benzo(a)pyrène (BaP). Le BaP induit des tumeurs chez de nombreuses espèces animales par

les trois voies d'expositions (inhalation, contact, ingestion). De plus, étant capable de passer la barrière placentaire, il a des effets embryotoxiques et terratogènes.

	Toxicité aiguë			Toxicité chronique		
	organismes aquatiques		organismes terrestres Annélides	organismes aquatiques		organismes terrestres Annélides
	Algues	Invertébrés		Algues	Invertébrés	
Naphtalène	<i>Selenastrum capricornutum</i> CE ₅₀ 2,96 mg.L ⁻¹	<i>Daphnia magna</i> CE ₅₀ 1,5-3,4 mg.L ⁻¹	n.d.	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> NOEC >4,3 mg.L ⁻¹	<i>Cerodaphnia dubia</i> NOEC 0,51 mg.L ⁻¹	n.d.
Phénanthrène	<i>Selenastrum capricornutum</i> CE ₅₀ 0,94 mg.L ⁻¹	<i>Daphnia magna</i> CE ₅₀ 0,35-0,4 mg.L ⁻¹	<i>Eisena foetida</i> 240 mg.kg ⁻¹	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> NOEC 0,0264 mg.L ⁻¹	<i>Daphnia magna</i> NOEC 0,021 mg.L ⁻¹	<i>Folsoma candida</i> NOEC 75 mg.kg ⁻¹
Benzo(a)pyrène	<i>Scenedesmus acutus</i> CE ₅₀ 5 µg.L ⁻¹	<i>Daphnia magna</i> CE ₅₀ > 2,7 µg.L ⁻¹	n.d.	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> NOEC 0,78 µg.L ⁻¹	<i>Cerodaphnia dubia</i> NOEC 0,50 µg.L ⁻¹	<i>Eisena foetida</i> LOEC 10 mg.kg ⁻¹

Tableau 2. Données toxicologiques pour 3 HAP (Pichard 2000a, b, c)

1.2 Devenir des HAP dans les sols

Afin de limiter l'extension d'une pollution par des HAP dans les sols, il est important de bien connaître quels sont les mécanismes intervenant dans leur devenir. Le devenir d'un composé organique dépend d'un ensemble de processus. Ceux-ci peuvent se séparer en deux :

- ↳ Mécanismes de transfert (en bleu Figure 1)
- ↳ Mécanismes de (bio)transformation (en vert Figure 1)

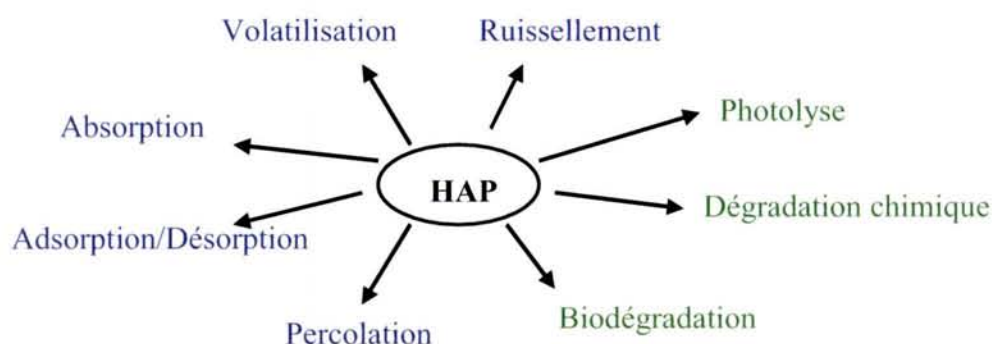


Figure 1. Mécanismes intervenant dans le devenir des HAP dans les sols (d'après Mahjoub 1999)

1.2.1 Transport des HAP dans les sols et les eaux souterraines

La dissémination d'un polluant à partir d'une source ponctuelle (zone de stockage, point de rejet...) dans le sol, est conditionnée par différents facteurs tels que les modes de transports et les transformations des polluants au cours de leur migration. La détermination de la prédominance d'un de ces facteurs constitue un des objectifs lors de l'évaluation de la faisabilité d'une méthode de traitement d'une pollution. Le transport des polluants peut se faire selon plusieurs mécanismes :

- ↳ Directement en phase liquide par diffusion et dispersion (Phase Liquide Non Aqueuse NAPL), en suivant les mouvements d'eau souterraine après dissolution.
- ↳ Par volatilisation dans la phase gazeuse du sol pour les polluants légers : BTEX (benzène/toluène/éthylbenzène/xylène), naphthalène.
- ↳ Adsorbés sur des phases porteuses telles que la matière organique en suspension ou dissoute

En zone non saturée, l'infiltration du polluant se fait à partir d'une phase liquide non aqueuse (NAPL), comme par exemple un goudron. Le cheminement de la pollution à partir de cette zone est complexe et dépend de paramètres tels que la perméabilité, l'adsorption de la NAPL sur la phase solide, la saturation en eau et la composition du mélange. L'air présent dans la zone non saturée contient des polluants en équilibre avec la phase liquide. Au cours du temps, la NAPL s'appauvrit en éléments légers, plus hydrosolubles, qui sont entraînés avec les mouvements de l'eau. Cette migration différentielle est plus ou moins marquée en fonction de la vitesse de disparition des polluants dans la phase aqueuse.

En zone saturée, les mécanismes de transport diffèrent avec la densité de la NAPL. Dans le cas de produits plus légers que l'eau (essence ou solvants aromatiques), la plume de contamination s'infiltré jusqu'à atteindre la frange capillaire où se forme une galette dont l'extension se poursuit tant qu'elle est alimentée par l'apport de produits. Pour les produits plus lourds que l'eau, ils coulent jusqu'au substratum imperméable une fois l'aquifère atteint. L'écoulement de cette NAPL dépend alors de la pente du substratum et des conditions d'écoulement de la nappe.

Au cours des différentes phases de dispersion de la plume, les polluants peuvent subir des transformations physico-chimiques et biologiques. Au niveau physico-chimique, les processus impliqués sont la volatilisation et la solubilisation partielle des polluants. En phase aqueuse, ces contaminants se mélangent à l'eau de l'aquifère formant un panache de pollution dont les mouvements sont régis par les phénomènes de transport convectif et de dispersion. Les transformations biologiques concernent essentiellement les mécanismes de dégradation, parfois incomplets, des polluants dans des conditions aérobies ou anaérobies suivant la saturation en oxygène de la nappe.

Les différents mécanismes de transport et de transformation entraînent une réduction de la teneur en contaminant en fonction de la distance à la source. La limite d'extension du panache se situe au niveau de la concentration maximale admise (CMA) qui correspond au seuil réglementaire ou au seuil de dosage. Au niveau de l'extension verticale de la pollution, les phénomènes de dispersion et de diffusion font que les concentrations en polluants deviennent homogènes dans le profil en fonction de la distance parcourue par le panache (Colin 2000).

1.2.2 Adsorption des HAP sur la phase solide

Les mécanismes de sorption et d'incorporation dans la matrice solide sont prépondérants dans le cas d'une pollution par des HAP dont la solubilité dans l'eau est limitée. Les surfaces solides impliquées dans la fixation des HAP sont les argiles et surtout les matières organiques qui possèdent de nombreux sites hydrophobes. Les mécanismes de sorption peuvent se décomposer en deux étapes : adsorption physique à la surface de l'interface solide et absorption (incorporation) dans la matrice solide en particulier la matière organique (Chiou *et al.* 1998). L'importance relative de ces deux mécanismes conditionne la disponibilité des HAP. Les cinétiques de ces deux mécanismes sont très différentes. La première phase d'adsorption se fait en quelques jours jusqu'à atteindre un pseudo-équilibre (Pignatello et Xing 1996). Par la suite, une phase plus lente de sorption peut se poursuivre sur un temps beaucoup plus long de quelques semaines à plusieurs mois. Cette deuxième phase est souvent négligée lors des tests d'adsorption car elle peut être confondue avec les variabilités expérimentales.

Le terme "vieillessement d'une pollution" est souvent utilisé pour définir l'ensemble de ces processus à long terme. Les mécanismes impliqués peuvent être de différentes natures : diffusion limitée dans les micropores des agrégats de sols, séquestration physique, incorporation dans la matrice organique suite à une transformation chimique ou biochimique. Ainsi, la répartition des HAP au sein d'un agrégat de sol évolue en fonction du temps de contact. Des études réalisées sur un sol sableux artificiellement contaminé par un mélange de 8 HAP (1 g.kg⁻¹ HAP total) montrent qu'après 12 mois d'incubation, les HAP se sont répartis dans les fractions granulométriques fines, argiles et limons fins (Amellal *et al.* 2001). La porosité présente dans cette fraction fine (pores de diamètre < 0,2 µm) peut être relativement importante. Ce volume de pores n'est pas physiquement accessible aux microorganismes et peut occuper jusqu'à 30% de la porosité totale (Hassink *et al.* 1993), ce qui pourrait expliquer, en partie, la présence d'une fraction récalcitrante à la biodégradation. Certains processus chimiques et biochimiques peuvent transformer la structure des HAP et favoriser la formation de résidus liés dont l'extractabilité et la biodisponibilité sont limitées. Dans ce cas, c'est l'établissement de liaisons covalentes entre les HAP et la matrice organique qui limitent l'accessibilité pour les microorganismes. Une extraction vigoureuse par un solvant organique permet de casser ces liaisons. Weissenfels *et al.* (1992) ont montré que les HAP présents dans ce type d'extrait sont biodégradables lorsqu'ils servent à recontaminer le sol d'origine.

Les mécanismes de désorption des HAP d'une phase solide peuvent également se décomposer en deux étapes avec des cinétiques différentes. Sun *et al.* (2003) ont étudié l'adsorption et la désorption du naphthalène et du pyrène sur des matériaux différents : particules de silice et billes d'alginate de calcium recouvertes ou non de matières humiques. Pour tous les matériaux testés, la phase d'adsorption rapide se poursuit par une deuxième phase d'adsorption plus lente, d'autant plus marquée en présence de matière organique. Ces auteurs montrent que les mécanismes d'adsorption ne sont pas réversibles et montrent des phénomènes d'hystérèse. Le vieillissement de la pollution se traduit par une réduction de la phase de désorption rapide sur tous les matériaux testés, due à des mécanismes de séquestration dans la microporosité.

1.2.3 Biodégradation des HAP dans les sols

Dans un sol, le temps de demi-vie d'un HAP est relativement long et augmente avec le nombre de cycles. De nombreux travaux (Boldrin *et al.* 1993, Juhasz *et al.* 1997, Kazunga et Aitken 2000, Moody *et al.* 2001, Providenti *et al.* 1995b, Yang *et al.* 1994), en milieu liquide, ont montré que la plupart des HAP pouvaient être catabolisés par un inoculum bactérien comme source de carbone et d'énergie ou par des mécanismes de cométabolisme. Ceci montre que les HAP sont potentiellement biodégradables. En présence d'une phase solide et selon les conditions expérimentales, une fraction des HAP n'est pas biodégradée. Différents mécanismes peuvent être à l'origine de cette diminution de leur taux de minéralisation :

- ↳ Concentration en HAP trop importante induisant un effet toxique.
- ↳ Concentration en HAP trop faible ne permettant pas le développement d'une microflore adaptée.
- ↳ Conditions expérimentales défavorables (déficit en nutriments minéraux, pH, humidité, taux d'oxygène).
- ↳ Disponibilité du composé limitée.

Le terme de biodégradation peut se définir comme la décomposition d'une molécule organique par un organisme vivant. Dans le cas des HAP, molécules organiques fortement réduites, cette dégradation se fait grâce à des oxydations successives. Dans l'environnement, il existe de nombreux microorganismes, bactéries et champignons, capables de dégrader des

HAP (Tableau 3). Aucun de ces microorganismes n'est capable de dégrader l'ensemble des HAP, en particulier les HAP composés de plus de 4 noyaux aromatiques (Cutright et Lee 1994a). La dégradation d'une molécule entraîne la formation d'un nouveau composé ou métabolite qui peut être à son tour dégradé par le même microorganisme ou par un autre. Dans certains cas, pour être efficace, le traitement d'un sol contaminé peut nécessiter la présence d'une microflore complexe capable de dégrader la molécule-mère et ses métabolites. Cette microflore pourrait être composée de plusieurs souches bactériennes comme cela a été suggéré par Meulenber *et al.* (1997), voire de l'association entre des bactéries et des champignons (Boonchan *et al.* 2000).

Genre bactérien	Genre fongique
<i>Pseudomonas</i>	<i>Phanerochaete</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Candida</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Corneybacterium</i>	<i>cladosporium</i>
<i>Aeoromonas</i>	
<i>Anthrobacter</i>	
<i>Rhodococcus</i>	
<i>Acinetobacter</i>	

Tableau 3. Microorganismes dégradant les HAP le plus souvent cités d'après (Cutright et Lee 1994a)

Il existe différents mécanismes de décomposition d'une molécule organique :

↳ La minéralisation constitue une dégradation complète et conduit à la production de CO₂. Ce processus fournit de l'énergie au microorganisme. Les microorganismes capables de minéraliser un HAP peuvent l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie. Dans le cas des HAP composés de plus de 5 noyaux aromatiques, la minéralisation est limitée.

↳ Le co-métabolisme constitue une dégradation partielle d'une molécule organique. Elle ne fournit pas d'énergie à l'organisme. C'est un mécanisme de co-oxydation qui implique des systèmes enzymatiques intervenant dans d'autres voies métaboliques. En présence d'un HAP léger (moins de 4 cycles), certaines souches bactériennes sont ainsi capables de dégrader des HAP plus lourds, (Boonchan *et al.* 2000, Hwang et Cutright 2002).

1.2.3.1 Dégradation par voie bactérienne

L'étape initiale de la dégradation des HAP par voie bactérienne est une incorporation de deux atomes d'oxygène grâce à une dioxygénase. Ce métabolite subit ensuite une autre oxydation pour former un *cis*-dihydrodiol (hydroxylation des deux groupements oxygène) (Figure 2) qui serait métabolisé en catéchol. Cette première réaction est une étape clef dans la dégradation des HAP ; seules les bactéries capables de les dégrader possèdent le système enzymatique adapté (Wilson et Jones 1993).

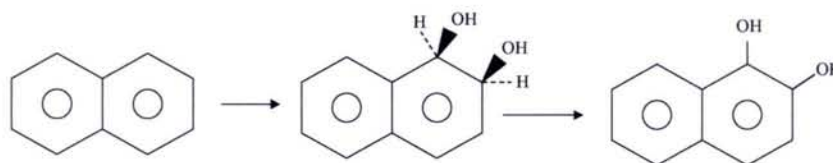


Figure 2. Etape initiale de la dégradation du naphthalène (Zylstra *et al.* 1994)

Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la dégradation des HAP appartiennent à des clusters. Le premier système enzymatique mis en évidence est celui codant pour la dégradation du naphthalène (souvent nommé NAPH) (Menn *et al.* 1993), (Zylstra *et al.* 1994). Churchill *et al.* (1999) ont montré que le système enzymatique impliqué dans le métabolisme des hydrocarbures aliphatiques présent dans une souche de *Mycobacterium*, pouvait également métaboliser des HAP à 3 ou 4 cycles. Ces systèmes enzymatiques, organisés en opéron (Zylstra *et al.* 1994), sont souvent portés par des plasmides (Providenti *et al.* 1995b). Il y a donc un risque de perte de la capacité de dégradation lors des cultures, si elles sont réalisées en absence de HAP.

Malgré une certaine homologie interspécifique au niveau des gènes impliqués dans la dégradation des HAP (Yang *et al.* 1994, Ahn *et al.* 1999, Khan *et al.* 2001), il n'existe pas une voie unique de dégradation pour un HAP. Ainsi Dean-Ross *et al.* (2001) ont montré une différence entre des bactéries gram + (Rhodococcus) et des gram- (Pseudomonas) lors du clivage du cycle aromatique. De même, Stringfellow et Aitken (1994) ont montré que deux souches de Pseudomonas de phénotype différent (fixé/libre) ne métabolisaient pas l'anthracène et le phénanthrène de manière identique. En condition aérobie, l'étude des voies métaboliques est difficile en raison du caractère transitoire de certains métabolites.

Dans le cas du phénanthrène, le métabolite le plus fréquemment observé est l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque. A partir de cette molécule, deux voies de dégradation existent. Dans un cas, l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque est dégradé en 1,2-dihydroxynaphthalene, qui est par la suite métabolisé, via la voie de dégradation du naphthalène, en salicylate. Dans l'autre cas, un des noyaux aromatiques de l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque est coupé et par la suite métabolisé via la voie du phtalate. Ces voies métaboliques sont accessibles en ligne http://umbbd.ahc.umn.edu/pha/pha_map.html, la Figure 3 présente la deuxième voie métabolique du phénanthrène aboutissant au phtalate.

Comme cela a été dit précédemment, la dégradation des HAP se produit grâce à des oxydations successives. Ce mécanisme est essentiellement aérobie avec l'oxygène comme accepteur final d'électron. Certaines souches bactériennes présentent des capacités de dégradation en condition anaérobie, en utilisant d'autres accepteurs d'électrons tels que les nitrates, les sulfates voire le dioxyde de carbone. Dans ces conditions, les bactéries retirent moins d'énergie au cours de la métabolisation et le taux de dégradation est plus faible (Leduc *et al.* 1992). Ce mécanisme est significatif dans le cas des BTEX et des HAP à 2 cycles (Schmitt *et al.* 1996) ainsi que les 3 cycles en conditions dénitrifiantes (Leduc *et al.* 1992). La dégradation anaérobie des HAP de plus de 4 cycles semble très limitée (Sharak Genthner *et al.* 1997). Au sein d'un aquifère, les conditions d'oxygénation peuvent être limitantes. Il semble donc important, le cas échéant, d'apporter une source complémentaire d'oxygène pour favoriser la dégradation aérobie des HAP dans le cadre d'une méthode de traitement d'un aquifère contaminé. Cet apport peut se faire grâce à l'ajout dans le milieu de peroxydes de magnésium ou de calcium qui au contact de l'eau libèrent de l'oxygène (Borden *et al.* 1997).

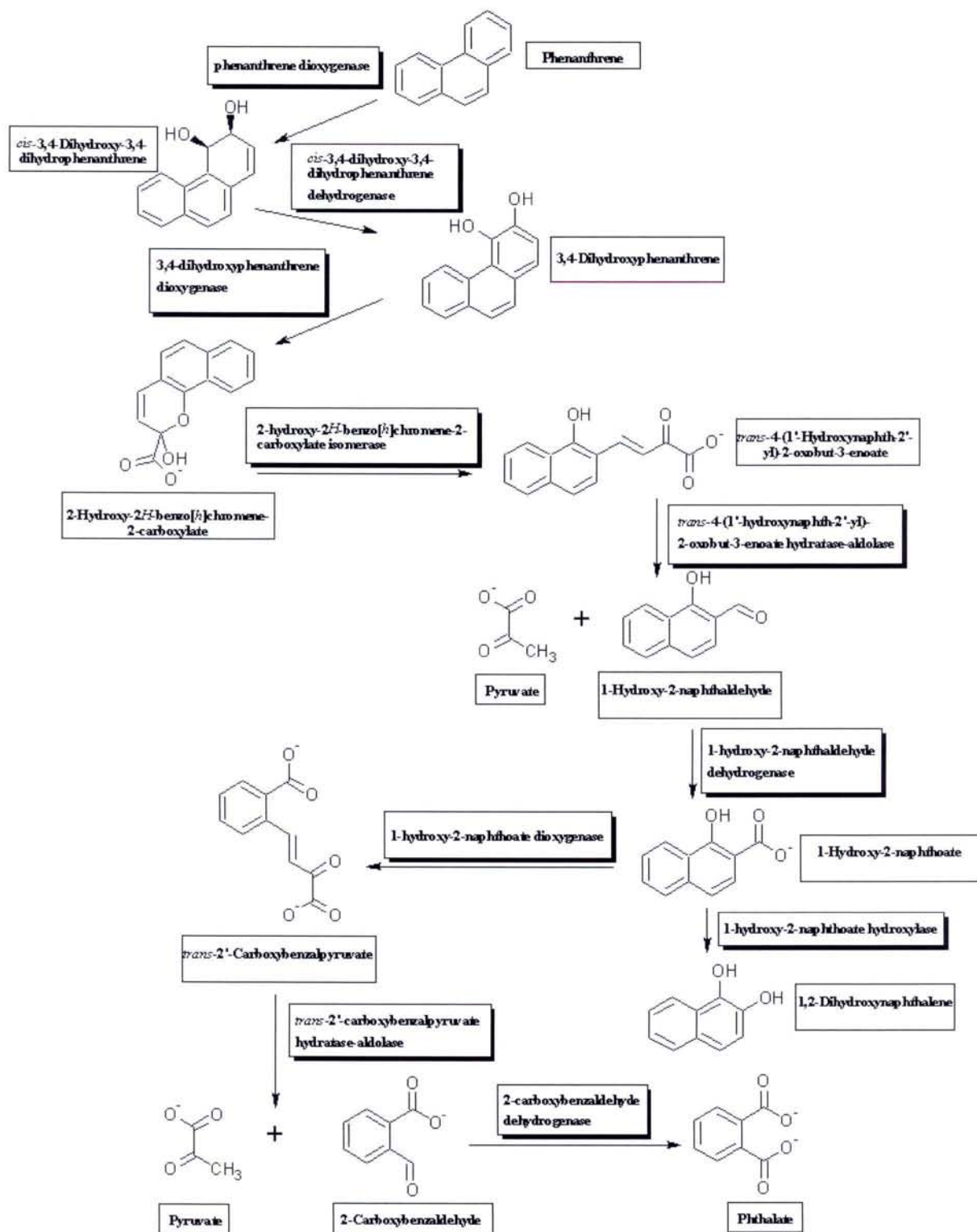


Figure 3. Voie de dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas* sp. s47p1, s7k5,
http://umbbd.ahc.umn.edu/pha/pha_map.html

1.2.3.2 Dégradation par voie fongique

Dans l'environnement, les champignons impliqués dans la dégradation des HAP sont de deux types :

↳ Les champignons ligninolytiques (communément appelés pourriture blanche) qui se développent sur du bois mort ou des débris organiques tels que *Phanerochaete chrysosporium* (Bogan et Lamar 1995), *Bjerkandera sp.* (Kaal *et al.* 1993), *Trametes versicolor* (Andersson et Henrysson 1996), *Pleurotus ostreatus* (Eggen et Majcherczyk 1998). Ces champignons possèdent des enzymes extracellulaires (lignine et manganèse peroxydase) capables de dégrader les composés de la lignine. La composition chimique de la lignine étant proche de celle des HAP (association de nombreux noyaux benzéniques), ces enzymes, de type dioxygénase, sont capables de dégrader les HAP.

↳ Champignons non ligninolytiques inférieurs souvent de la classe des Zygomycètes (Krivobok *et al.* 1998). Leur capacité de dégradation des HAP est due à la présence d'une monooxygénase de type cytochrome P-450.

Les champignons ligninolytiques sont les plus étudiés et présentent une réelle capacité de dégradation des HAP, même ceux à 5 cycles tels que le benzo-a-pyrène (Eggen et Sveum 1999).

1.2.3.3 Facteurs intervenant dans les mécanismes de biodégradation

Les mécanismes de dégradation des HAP dans les sols par les microorganismes sont contrôlés par un certain nombre de paramètres tels que l'accessibilité et la biodisponibilité du polluant, la présence d'une microflore adaptée, les paramètres environnementaux.

La capacité d'un microorganisme à dégrader une molécule nécessite une étape de contact entre la membrane cellulaire et le composé organique. Comme cela a été dit précédemment, la faible hydrosolubilité des HAP et leur caractère hydrophobe les conduit à se fixer fortement sur les surfaces solides telles que la matière organique. Cette diminution de la fraction en solution peut entraîner une baisse de la biodisponibilité (Alexander 1994). Cependant, (Hatzinger et Alexander 1995) ont montré que le taux de minéralisation du phénanthrène en batch par un consortium bactérien isolé d'un sol contaminé était semblable

dans des traitements avec ou sans surface solide. De même (Laor *et al.* 1996) ont réalisé des essais de dégradation du phénanthrène en présence de différentes quantités d'acides humiques afin de tester l'effet du pourcentage de phénanthrène adsorbé sur sa minéralisation. Dans cette étude, le taux de minéralisation du phénanthrène était similaire pour tous les traitements, montrant que la dégradation du phénanthrène était dans ces conditions, uniquement contrôlée par des mécanismes de dissolution. Cette diminution de la disponibilité des HAP peut réduire leur toxicité (Weissenfels *et al.* 1992).

Woo *et al.* (2001) ont proposé un modèle décrivant la biodégradation du phénanthrène dans un système en batch contenant une phase solide sur laquelle se fixe le phénanthrène. Dans certains cas, les microorganismes étudiés sont capables de dégrader des HAP adsorbés à un taux supérieur à celui imposé par les équilibres de dissolution. Des essais de dégradation du fluoranthène et du phénanthrène par un consortium bactérien dominé par le genre *Pseudomonas sp.* en présence de sédiment marin Poeton *et al.* (1999) ont montré un taux de minéralisation plus important en présence de sédiment par rapport à des traitements où le phénanthrène était uniquement en solution. Les microorganismes dégradants pourraient accéder à la fraction adsorbée grâce à des mécanismes dont la cinétique est plus rapide que la cinétique de désorption. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène : augmentation locale de la solubilité des HAP, création d'un gradient de concentration, contact direct entre les microorganismes et les HAP.

Les HAP sont peu solubles dans l'eau, cependant la présence de composés organiques en solution peut augmenter leur solubilité. Certaines souches bactériennes sont capables de produire des surfactants qui augmentent la solubilisation des HAP (Scheibenbogen *et al.* 1994, Van Dyke *et al.* 1993a, b). La présence de surfactant peut avoir des effets différents sur la dégradation des HAP selon les systèmes expérimentaux testés. La production de rhamnolipide par *Pseudomonas aeruginosa* a un effet positif sur la solubilisation et la biodégradation du phénanthrène en batch (Providenti *et al.* 1995a, b). Garcia Junco *et al.* (2003) ont également observé une augmentation de la solubilisation des HAP (naphtalène, fluorène, phénanthrène, pyrène), en particulier le pyrène, présent initialement dans une NAPL, en présence de surfactant, cependant aucun effet significatif n'a été observé sur leur minéralisation. Au-dessus de la Concentration Micellaire Critique, la présence de surfactant peut avoir un effet inhibiteur sur la biodégradation (Laha et Luthy 1991). La production de biopolymères peut également favoriser la biodisponibilité des HAP. Eriksson *et al.* (2002) ont

isolé des souches bactériennes dans un biofilm qui présentent des capacités importantes de dégradation de phénanthrène adsorbé. La présence du biofilm semble augmenter la surface de contact bactéries-HAP. De plus, la présence de composés organiques dans le biofilm accentue localement la solubilité des HAP.

Le contact direct HAP-bactéries semble donc jouer un rôle dans la capacité de certaines souches bactériennes à dégrader les HAP adsorbés sur une surface solide. Poeton *et al.* (1999) ont montré une augmentation de l'adhésion bactérienne sur le sédiment en présence de phénanthrène. De même, Hwang et Cutright (2002) ont montré l'importance de l'adhésion bactérienne lors de la minéralisation du pyrène par un consortium isolé d'un sol contaminé par des polluants organiques. L'adsorption directe des bactéries sur leur substrat pourrait permettre la création d'un gradient de concentration qui accélérerait la cinétique de désorption (Harms et Zehnder 1994).

Les propriétés des souches bactériennes dans le cas d'une culture pure ou dans une communauté semblent donc conditionner leur capacité à dégrader les HAP adsorbés sur une surface solide. L'utilisation des méthodes classiques d'isolement des bactéries dégradantes en milieu liquide ne permet pas toujours de sélectionner des souches bactériennes capables de dégrader des HAP adsorbés. En effet, Kästner et Mahro (1996) ont montré qu'une souche bactérienne isolée à partir de cultures où la source de phénanthrène est uniquement en solution, était moins efficace pour dégrader du phénanthrène adsorbé à une phase solide. Au contraire, Tang *et al.* (1998) ont utilisé une méthode de sélection où l'unique source de phénanthrène est adsorbée sur un support en polyacrylique. La souche sélectionnée était capable de dégrader le phénanthrène adsorbé plus rapidement que le taux de désorption physico-chimique. L'utilisation de ce type de méthode d'isolement permet d'induire une double pression de sélection vis-à-vis de la source de carbone (HAP uniquement) et vis-à-vis de sa disponibilité (HAP adsorbé). Les souches sélectionnées présentent des capacités importantes de dégradation des HAP adsorbés (Bastiaens *et al.* 2000, Friedrich *et al.* 2000, Grosser *et al.* 2000).

Les facteurs environnementaux interviennent également dans les mécanismes de biodégradation des HAP dans les sols. En effet, l'apport de macronutriments (azote, phosphore) et surtout de micronutriments (calcium, fer, magnésium) semble stimuler l'activité de dégradation des champignons ligninolytiques (Liebeg et Cutright 1999). Cette

augmentation de l'activité de dégradation pourrait être due à l'induction de la lignine peroxydase (LiP) impliquée dans la dégradation des HAP (Kaal *et al.* 1993). Au niveau de l'activité bactérienne, l'apport de macronutriments peut avoir différents effets. Berthelin *et al.* (1996) ont montré que l'apport de ces nutriments avec un rapport C/N/P favorisait les mécanismes de biodégradation des polluants organiques. Cependant cet effet positif semble dépendant du statut de ces éléments dans le sol (Johnson et Scow 1999). En effet, Hwang et Cutright (2002) ont montré que l'apport de nutriments azotés ou phosphatés ne semble pas avoir d'effet significatif sur la biodégradation. Le pH du sol peut également influencer la disponibilité des HAP. En effet, lorsque le pH est acide, la protonation de la matière organique accentue son caractère hydrophobe. Dans ces conditions, l'extractibilité et la biodisponibilité des HAP comme le benzo-a-pyrène est plus faible (Marschner *et al.* 1999). La force ionique de la solution du sol peut également influencer la disponibilité des HAP. En effet, une force ionique plus forte réduit l'épaisseur de la double couche électronique à la surface des matières organiques, ce qui permet le rapprochement des sites hydrophobes et favorise les interactions HAP-matière organique (Marschner *et al.* 1999).

Comme cela a été dit précédemment la dégradation des HAP en condition anaérobie est plus lente (Leduc *et al.* 1992). La teneur en oxygène (gazeux ou dissous) dans un sol peut donc être limitante dans les processus de biodégradation par les microorganismes.

1.3 Traitement des sols et des eaux souterraines contaminées par des HAP

1.3.1 Critères de choix et procédés de dépollution

Les technologies et méthodes de décontamination des sols et des nappes pollués sont nombreuses et le choix de l'une d'entre elles est un problème délicat qui doit tenir compte de contraintes techniques et économiques (Colin 2000). Le choix de la méthode de décontamination doit également dépendre des objectifs à atteindre en fonction de l'impact potentiel de la pollution sur l'environnement, sur la santé publique et de son utilisation future afin de garantir et de veiller durablement à son affectation.

La connaissance du type de polluant, de ses caractéristiques physico-chimique constitue la première étape dans la prise de décision pour une méthode de décontamination. Au niveau des pollutions par des composés organiques, les sources principales de contamination sont les NAPL qui peuvent être séparées en deux suivant leur densité par rapport à l'eau. En effet, cette propriété va déterminer leur devenir au niveau de la zone saturée :

- ↪ Migration au niveau du toit de la nappe pour les composés moins denses que l'eau
- ↪ Pénétration de la zone saturée et migration au fond de la nappe

Les méthodes de dépollution peuvent se classer suivant différents critères. En fonction de la localisation du traitement deux catégories peuvent être distinguées :

- Méthodes sur site ou "on site" parmi lesquelles il est possible de distinguer les techniques *in situ* : le sol est maintenu en place ce qui peut permettre de maintenir une activité sur le site et de ne pas le perturber (biosparging, bioventing). L'efficacité de ces méthodes est variable et limitée par l'accessibilité des polluants. Les méthodes sur site se font après excavation des terres contaminées (land farming, biotertres). Les méthodes de confinement de la pollution grâce à l'utilisation de méthodes de génie civil (géomembranes, injection de bentonite) constituent également des méthodes "on site" qui peuvent être *in situ* ou sur site
- Méthodes hors du site "off site" par excavation des sols contaminés ou pompage des eaux souterraines, si le traitement est réalisé dans un centre de traitement extérieur.

La classification des méthodes de traitement peut également se faire selon le principe de fonctionnement :

- Techniques physico-chimiques qui visent à concentrer les polluants vers des points de récupération afin d'y être traités ou confinés : pompage, écrémage, venting, confinement.
- Techniques thermiques surtout utilisées pour traiter des sols contaminés. Les méthodes les plus utilisées sont la désorption thermique et l'incinération.
- Techniques biologiques qui consistent à dégrader les polluants grâce à l'activité des microorganismes. L'extrapolation des résultats obtenus en laboratoire est souvent rendue difficile à cause de la complexité du milieu naturel. Elles sont toutefois largement préconisées en finition d'une technique physique.

Le site contaminé peut être vu comme un réacteur biochimique à la fois source de polluant et milieu à traiter. La Figure 4 présente les différentes interactions qui conditionnent l'efficacité d'une méthode de traitement. Lors du choix de la méthode de traitement, le gestionnaire s'attache à renseigner chacun des éléments : propriétés physiques et thermodynamique des polluants, propriétés des sols et des aquifères, caractéristiques d'adsorption et de désorption des polluants, cinétique de (bio)transformation, hydrodynamique et transport.

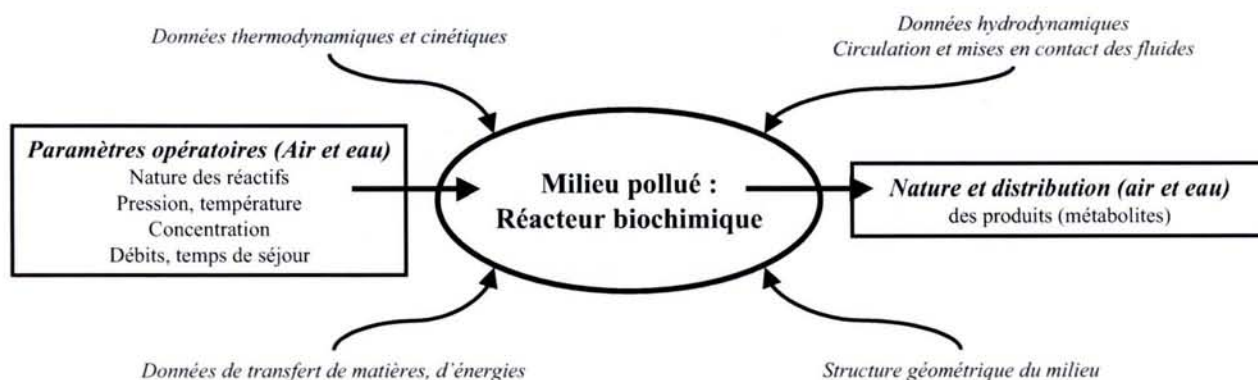


Figure 4. Le milieu pollué comme réacteur biochimique (d'après Villermaux 1993).

1.3.2 Les Barrières Perméables Réactives (BPR)

1.3.2.1 Principe

L'intérêt pour les BPR est croissant depuis le début des années 80. En effet, dans le cadre du traitement des aquifères contaminés il s'agit d'une technique de traitement *in situ* qui présente de nombreux avantages techniques et financiers par rapport à d'autres méthodes de remédiation (pompage, stockage et traitement de l'effluent). Cette barrière est implantée de telle sorte que le flux d'eau contaminée (ou plume) s'écoule passivement suivant le gradient naturel au travers du matériau réactif (EPA 1998). Le matériau utilisé doit constituer une barrière pour les contaminants qui y sont piégés, dégradés ou transformés en éléments non toxiques suivant le type de pollution et de matériau utilisé (Figure 5). La BPR ne doit pas constituer un obstacle à l'écoulement de l'eau. Actuellement, cette technique est principalement utilisée pour traiter des pollutions par des éléments en traces métalliques (dont les radionucléides) ou des polluants organiques organo-chlorés (Scherer *et al.* 2000, Simon et Meggyes 2000).

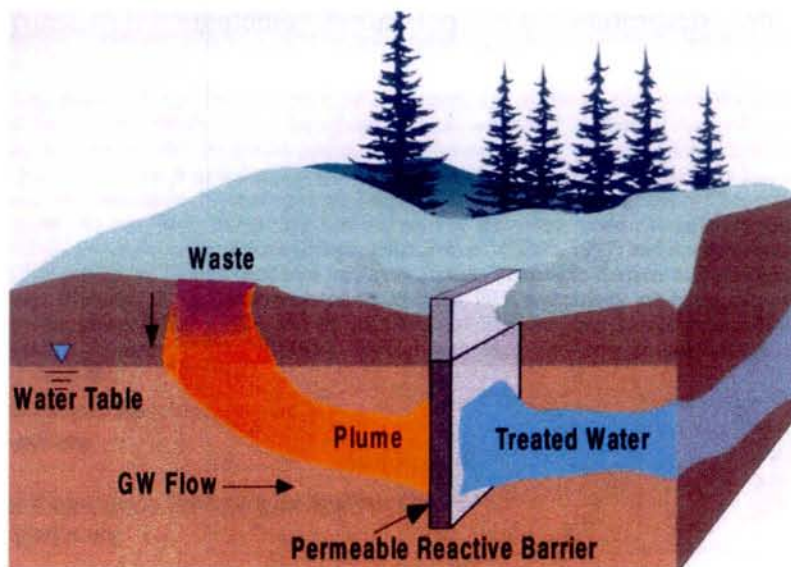


Figure 5. Schéma de fonctionnement d'une Barrière Perméable Réactive d'après (EPA 1998).

Actuellement, il est possible de classer les BPR en trois catégories suivant le mécanisme de traitement de l'aquifère : sorption, biotraitement et traitement chimique. Ce dernier mécanisme ne semble pas applicable au traitement des HAP. Les mécanismes de sorption conduisent à la fixation des polluants sur les matériaux réactifs. Ils regroupent

différents aspects tels que l'adsorption de polluants organiques (Rael *et al.* 1999) et les réactions de précipitation de nombreux polluants métalliques (Scherer *et al.* 2000) . Les réactions de précipitation ne semblent pas intervenir lors de l'adsorption des HAP sur une phase solide.

Selon le type de polluant, des bio-barrières peuvent être mises en place. En effet, la présence de micro-organismes adaptés au polluant permet d'en accentuer la biotransformation ou la biodégradation. Par exemple, dans le cas d'une pollution par le mercure, certaines bactéries sont capables de fixer des groupements méthyles sur celui-ci et de favoriser sa volatilisation (EPA 1998). Cependant, la présence de communautés bactériennes dans la barrière peut également avoir des effets négatifs sur son fonctionnement. En effet, le maintien d'une communauté dégradante au sein de la BPR peut induire la formation d'un biofilm dont la croissance peut diminuer la perméabilité de la BPR et réduire les surfaces de contact entre les polluants et les matériaux réactifs. Une rencontre avec Mme Esnault-Filet de la société Solétanche bachy, spécialisée dans la mise en œuvre de BPR, a confirmé les craintes des gestionnaires de BPR vis-à-vis de la présence de microorganismes dans ce type de traitement.

1.3.2.2 Application à la pollution par des HAP

Peu de travaux ont été réalisés sur le traitement d'une pollution par les HAP ou les hydrocarbures aromatiques (Rael *et al.* 1993) grâce à cette méthode. En 1997, sur 124 projets de BPR répertoriés aux USA, seulement 2% concernaient une pollution par un HAP, le naphthalène (Scherer *et al.* 2000). L'adsorption des HAP sur un matériau réactif se produit grâce à des interactions hydrophobes. Le coefficient de partage octanol/eau élevé des HAP fait que ce mécanisme est rapide avec des interactions fortes. De nombreux travaux se sont intéressés à ces interactions : zéolite modifiée / perchloroéthène (Li et Bowman 1998), kaolinite recouverte par un fioul lourd / phénanthrène (Gaboriau et Saada 2001), charbon actif / benzène (Rael *et al.* 1993), tourbe / percolat de créosote (Rasmussen *et al.* 2002). Le matériau sélectionné doit donc présenter des surfaces hydrophobes afin de fixer des quantités importantes de HAP.

Dans le cas de l'utilisation de matières organiques pour la fixation des HAP au sein d'une BPR, la formation de résidus liés peut intervenir. Comme cela a été dit précédemment,

après une première phase rapide d'adsorption, des mécanismes plus lents de diffusion des HAP dans la matière organique aboutissent à la formation de résidus liés. Ce mécanisme se divise en deux étapes, tout d'abord une séquestration physique des polluants dans la matière organique puis une transformation chimique (humification) avec formation de liaisons fortes (Chiou *et al.* 1998).

Les mécanismes de biodégradation au sein d'une barrière font intervenir les capacités d'oxydoréduction des bactéries. Comme cela a été dit précédemment, la dégradation des HAP se fait principalement par oxydation. Les processus aérobies d'oxydation, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électron, sont les plus efficaces par rapport à l'utilisation d'autres accepteurs comme les nitrates (Leduc *et al.* 1992). Au sein d'une BPR, la quantité limitée d'oxygène dissout pourrait être compensée par l'ajout d'ORC (Oxygen Releasing Compounds) comme le peroxyde de calcium. Toutefois, leur utilisation pourrait aussi par l'apport d'oxygène favoriser la précipitation d'oxydes de fer et induire des risques de colmatage.

La dégradation d'un polluant organique au sein d'une BPR entraîne la production de métabolites. Dans le cas des HAP, ceux-ci sont plus polaires suite à l'incorporation d'atomes d'oxygènes et à la dégradation des cycles. L'augmentation de leur polarité induit une plus grande hydrosolubilité ce qui augmente leur mobilité et leur biodisponibilité (Meulenberg *et al.* 1997) dans l'environnement. Ces composés sont parfois dégradés par d'autres souches bactériennes moins spécialisées. La dispersion dans l'environnement de ces métabolites en aval de la BPR pourrait avoir des conséquences négatives. En effet, dans certains cas, la dégradation des HAP peut entraîner une activation métabolique, c'est-à-dire que les métabolites sont plus toxiques que le composé mère.

Orientation et objectifs de l'étude

L'objectif du travail réalisé est d'étudier les interactions entre les bactéries, les HAP et différents matériaux en vue de mettre au point une technique de barrière perméable réactive dans le cadre d'une contamination par des HAP. L'intérêt de cette étude est de combiner une approche physico-chimique de fixation des polluants sur le matériau de la barrière avec une approche biologique de biodégradation grâce à des bactéries. Pour cela, il était nécessaire de bien comprendre les mécanismes et les conditions de rétention des HAP au sein de la barrière (Cinétique d'adsorption / désorption), de fixation des bactéries sur cette barrière et les conséquences sur la biodégradation des HAP (accessibilité des polluants aux microorganismes).

Dans cette optique, la cinétique d'adsorption et de désorption d'un HAP modèle, le phénanthrène, sur différents matériaux a tout d'abord été étudiée. Le choix de ces matériaux a été déterminé en fonction de plusieurs critères, leurs propriétés d'adsorption et/ou de filtration et leur coût compatible avec une utilisation à grande échelle. Trois matériaux ont été présélectionnés : le charbon actif au vu de son utilisation dans de nombreux procédés de dépollution (Rael *et al.* 1993), la pouzzolane utilisée comme support de lit bactérien dans le traitement d'eaux résiduaires d'origine agroalimentaire (Menoret 2001) et la pouzzolane recouverte par un composé organique. En effet, différents travaux sur la kaolinite ont montré que lorsque celle-ci était recouverte de composés organiques (Murphy *et al.* 1990), sa capacité de sorption du phénanthrène était plus importante.

Parmi les différents matériaux testés, le charbon actif a été retenu pour la suite de ce travail. En effet, il présentait la plus forte capacité d'adsorption du phénanthrène (voir chapitre 3.2) et des essais de biodégradation du phénanthrène ont montré un taux de minéralisation plus important en présence de charbon actif par rapport à des échantillons sans matériaux (voir chapitre 3.2).

Dans une deuxième partie de ce travail, l'adsorption des bactéries sur le charbon actif a été étudiée (voir chapitre 3.3). Les propriétés physiologiques des microorganismes dégradant les HAP, en particulier leur capacité à produire des biopolymères, peuvent influencer leur fixation, la biodisponibilité des HAP, et leur biodégradation (voir chapitre

1.2.3.3). Il est apparu important de comparer des bactéries produisant ou non des biopolymères. Pour cela cinq souches bactériennes capables de dégrader les HAP ont été utilisées, trois d'entre elles produisant des biopolymères et formant des biofilms. Des isothermes d'adsorption de ces cinq bactéries sur le charbon actif ont été réalisées. Pour caractériser les propriétés des membranes bactériennes, qui peuvent être impliquées dans ces phénomènes d'adsorption, différentes méthodes ont été utilisées. L'affinité des souches vis-à-vis d'une surface hydrophobe a été estimée par le test MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon, (Jenkins et Lion 1993). Les potentiels électrocinétiques et les propriétés électrochimiques des surfaces bactériennes ont été évalués par des mesures de potentiel zéta et des titrages potentiométriques acido-basiques.

Le taux de minéralisation du phénanthrène par les cinq souches bactériennes a été étudié dans des expériences en batch (voir chapitre 3.4) puis en colonne (voir chapitre 3.5). Les expériences en batch ont été réalisées avec du phénanthrène marqué ou non au ^{14}C , en présence ou en absence de charbon actif. Un bilan du phénanthrène adsorbé et dégradé a été effectué. Pour se rapprocher des conditions dynamiques réelles d'une BPR, des essais en colonnes ont été réalisés avec deux des souches bactériennes pour suivre au cours du temps la fixation du phénanthrène et des bactéries dans les colonnes de charbon actif et la biodégradation du phénanthrène. Des observations en microscopie confocale ont permis de préciser la répartition des bactéries sur les grains de charbon actif dans les essais en batch et en colonnes.

Matériels et Méthodes

2 Matériels et méthodes

2.1 Matériels

2.1.1 Matériaux testés

Trois matériaux ont été testés au cours de cette étude : un charbon actif (CA) et une pouzzolane recouverte (PzF) ou non (Pz) par un composé organique d'origine anthropique (fioul lourd).

Le charbon actif a été fourni par la société PICA France. Il est issu de la pyrolyse de noix de coco (PICACTIF TE60). Cette étape de pyrolyse permet le développement de la structure interne des pores. Il présente une granulométrie millimétrique (0,85 – 1,1 mm).

La pouzzolane utilisée est une roche d'origine pyroclastique peu consolidée et poreuse. Ce type de matériau est utilisé comme support de lit bactérien. La granulométrie de la pouzzolane est comprise entre 4 et 5 mm. Le recouvrement de Pz par le fioul a été effectué selon une méthode adaptée de Gaboriau et Saada (2001) : une quantité de 100g de Pz est mise en agitation avec une solution de toluène contenant 1 g.L⁻¹ de fioul lourd n°2 (F2, Shell, Couronnaise de raffinage, Le Petit-Couronne, France) pendant 96h, temps nécessaire pour atteindre l'équilibre. Les matériaux recouverts sont ensuite lavés au toluène par soxhlet pendant 24h afin d'éliminer le fioul faiblement fixé à la surface de la pouzzolane. Ils sont alors séchés sous une hotte afin d'éliminer les traces de solvant organique. Des mesures de carbone organique réalisées sur Pz et PzF avec un analyseur élémentaire (CHNS-O 1108 Carlo Erba analyser) montrent que la quantité de fioul adsorbé à la surface de Pz est très faible (0,25 g.kg⁻¹).

2.1.2 Souches bactériennes : origines et isolement

5 souches bactériennes dégradant les HAP nommées NAH1, MATE3, MATE7, MATE10 et MATE12 ont été utilisées au cours de cette étude. Elles ont été isolées à partir de sols contaminés par des HAP. La souche NAH1 a été isolée à partir d'un sol landais (spodosol) artificiellement contaminé par un mélange de HAP (1 g.kg⁻¹), essentiellement par des HAP à 3 cycles (50% en masse) (Amellal *et al.* 2001). Les souches MATE3, 7, 10 et 12

ont été isolées d'un sol de friche industrielle du nord de la Moselle (Leyval *et al.* 2001). Ce sol se caractérise par une texture sablo-limoneuse et une teneur en HAP totale (16 HAP prioritaires de l'US-EPA) de $1,36 \text{ g.kg}^{-1}$. La distribution des différents HAP montre une prédominance des HAP lourds de plus de 4 cycles (70% en masse) (Amellal *et al.* 2001, Leyval *et al.* 2001).

L'isolement des différentes souches bactériennes a été effectué à partir de suspensions-dilutions d'échantillons de sols de différentes fractions granulométriques et ensemencement sur milieu solide contenant un mélange de 4 HAP comme seule source de carbone selon la méthode décrite par Binet *et al.* (2000) et Amellal *et al.* (2001).

Le choix des souches utilisées a été aussi effectué par rapport à la production de biofilm. Cette capacité des souches bactériennes à produire des biofilms a été observée, dans un premier temps, au cours des étapes d'isolement effectuées sur milieu solide, par l'observation du morphotype des colonies se développant sur les cristaux de HAP, puis lors des cultures en milieu liquide. Des observations en microscopie confocale (voir paragraphe 3.4.1) ont permis de confirmer ces observations.

2.1.3 Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP)

Le HAP utilisé pour l'ensemble des expériences réalisées a été le phénanthrène (PHE). Il est constitué de 3 noyaux benzéniques ($\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) formant une structure plane. Les propriétés physico-chimiques du PHE ont été rappelées dans le paragraphe 1.1.2. Le choix de cette molécule répond à plusieurs critères :

- ↳ Hydrosolubilité la plus importante après le naphthalène parmi les 16 HAP figurant dans la liste de l'US-EPA.
- ↳ Tension de vapeur beaucoup plus faible que le naphthalène
- ↳ Biodégradabilité avérée

Deux sources, marquées ou non au ^{14}C , de PHE ont été utilisées au cours des différentes expérimentations :

- ↳ $^{14}\text{C}_9$ -PHE, pureté > 98 %, activité spécifique $8,2 \text{ mCi.mmol}^{-1}$ (Sigma)
- ↳ PHE non marqué au ^{14}C (froid), pureté > 97 % (Fluka)

2.2 Méthodes

2.2.1 Culture bactérienne et méthodes de dénombrement

Après isolement, les souches bactériennes ont été stockées à -80°C dans un milieu LB glycérimé (Luria-Bertani, 10 g peptone, 5 g extrait de levure, 5 g NaCl, H_2O qsp 1L ; glycérol 50% v/v, Sigma). Les 5 souches sélectionnées ont été régulièrement repiquées dans un milieu sélectif ne contenant que du phénanthrène comme source de carbone (Bushnel Haas (BH-Difco) $3,27 \text{ g.L}^{-1}$, phénanthrène, 200 mg.L^{-1}) afin de maintenir une pression de sélection et éviter la perte éventuelle de la capacité de dégradation qui peut être portée par un plasmide (voir chapitre 1.2.3.1).

La croissance bactérienne sur le milieu sélectif est faible et ne permet pas d'avoir une biomasse suffisante pour préparer un inoculum. Afin d'effectuer toutes les expériences avec un inoculum bactérien comparable, celui-ci a été préparé de manière identique avant chaque expérimentation : $20 \mu\text{L}$ de milieu sélectif contenant une souche bactérienne sont apportés dans un milieu nutritif Luria-Bertani (LB). Après 48h de croissance, l'inoculum est rincé trois fois avec une solution saline ($\text{NaCl } 8,5 \text{ g.L}^{-1}$) avant utilisation.

Le dénombrement des bactéries fixées sur le charbon actif a été réalisé par désorption physico-chimique suivant un protocole adapté de Dziurla *et al.* (1998). 5 mg de CA sont placés dans un eppendorf et vortexer pendant 5 minutes avec 2 mL d'une solution saline ($\text{NaCl } 8,5 \text{ g.L}^{-1}$) contenant un surfactant (Tween 80 10% v/v), après ce traitement l'échantillon est laissé 10 minutes en contact avant d'être à nouveau vortexer pendant 5 minutes. Le dénombrement des bactéries désorbées dans le surnageant a été réalisé directement en cellule de Thoma.

Deux méthodes de dénombrement des bactéries en suspension ont été utilisées au cours des différentes expériences : comptage direct sur cellule de Thoma et dénombrement en microplaque par la technique NPP :

↳ Comptage sur cellule de Thoma (Preciss, Bioblock). Une goutte de suspension bactérienne est disposée sur la zone quadrillée de la lame de Thoma avant d'être recouverte par une lamelle. La zone quadrillée délimite 16 champs composés chacun de 16 carrés. Le

comptage des bactéries se fait sur 4 champs. Connaissant le volume correspondant à un carré, la moyenne du nombre de bactéries par carré est multiplié par 4×10^6 pour obtenir le nombre de bactéries par mL.

↳ Dénombrement en microplaque. Le dénombrement des bactéries dégradantes se fait selon la méthode décrite par Binet *et al.* (2000). Dans chaque puit de la microplaque, 20 μL d'un mélange de HAP (90 mg phénanthrène, 9 mg d'anthracène, 9 mg de fluorène et 9 mg de fluoranthène, 8 mL d'héxane) sont apportés. Après évaporation du solvant, 200 μL d'une solution de BH ($3,27 \text{ g.L}^{-1}$) sont ajoutés. A partir de chaque échantillon, différentes dilutions successives de facteur 10 sont réalisées dans une solution de NaCl ($8,5 \text{ g.L}^{-1}$). 25 μL des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} sont utilisés pour inoculer la moitié d'une microplaque (5 lignes de 8 puits). En parallèle, des témoins abiotiques sont réalisés. Après 3 semaines d'incubation à 28°C à l'obscurité, la présence de bactéries dégradantes dans un puit se traduit par l'apparition d'une coloration jaune-orangée due à l'accumulation de métabolites issus de la dégradation d'un des 4 HAP. La lecture des microplaques se fait par lecture des densités optiques à 405 nm et 620 nm par un spectromètre (CERES UV 900C, Bio-tek instrument.inc) et soustraction de $\text{DO}_{405} - \text{DO}_{620}$. Un programme de calcul NPP utilisant les tables de Mac Crady permet de déterminer le nombre de bactéries par mL.

2.2.2 Identification des souches bactériennes

L'identification des souches isolées a été réalisée par amplification d'ADN ribosomique 16S à l'aide d'amorces universelles (968f et 1401r) puis séquençage.

Pour chaque souche, 10 μL du milieu glyciné sont étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu NB solidifié (Nutrient Broth 4 g.L^{-1} , Agar 15 g.L^{-1} , Difco). Après 24 à 48 heures, une colonie bactérienne est prélevée, mise en suspension dans 20 μL d'eau distillée stérile et placée 24 heures à -20°C avant amplification par PCR grâce à un thermocycleur (Icycler, Biorad).

Le programme d'amplification débute par un cycle de 10 minutes à 94°C , permettant la détérioration de la paroi et la libération de l'ADN dans le milieu réactionnel. Ce cycle permet également la dénaturation de l'ADN double brin. Le tableau 4 récapitule la composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification du gène 16S.

Le programme de PCR se poursuit par un cycle comprenant trois étapes répétées 25 fois :

- **Dénaturation** : 94°C pendant 45 secondes,
- **Hybridation** : 55°C pendant 30 secondes,
- **Elongation** : 72°C pendant 30 secondes.

Le programme de PCR se termine par une phase d'élongation terminale de 7 minutes à 72°C permettant de compléter toutes les réactions de polymérisation.

Réactifs	Molarité de la réaction	Volume de réactif pour une réaction PCR
Eau ultrapure		34,5 µL
Tampon		
Tris-HCl	50 mM	5 µL
KCl	10 mM	
NH ₄ SO ₄	5 mM	
MgCl ₂	3 mM	6 µL
dNTP	0,2 mM	1 µL
Amorces	2 mM	2x1 µL
<i>Séquences 968f</i>		
5' AACGCGAAGAACCTTAC ^{3'}		
<i>Séquences 1401r</i>		
5' CGGTGTGTACAAGACCC ^{3'}		
Taq polymérase	2 U	0,5 µL

Tableau 4. Composition du milieu réactionnel d'amplification du gène 16S

La qualité des produits d'amplification est vérifiée sur gel d'agarose à 1% (m/v). Les produits d'amplification sont alors purifiés sur colonne en utilisant un kit High PureTM PCR purification product (Roche diagnostic), selon les recommandations du fabricant. Après purification, les produits sont quantifiés sur gel d'agarose à 1% (m/v) par rapport à un marqueur de masse (Mass ruler, Biorad). Une aliquote de 75 ng d'ADN est prélevée, séchée à l'air et envoyée pour séquençage à MWG Biotech (Courtaboeuf, France). Les séquences obtenues sont comparées à la banque de données en ligne Genbank par le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

2.2.2 Essais d'adsorption

2.2.2.1 Isotherme d'adsorption et de désorption du phénanthrène sur les matériaux testés

Les isothermes ont été réalisées d'après le protocole décrit par Gaboriau et Saada (Gaboriau et Saada 2001) adapté à notre étude. Les essais avec Pz et PzF ont été réalisés dans des flacons en pyrex de 20 mL, fermés par un septum en téflon, contenant 2g de Pz ou 0,5g de PzF et 10 mL de solution de PHE. Les essais avec le charbon actif (CA) ont été réalisés dans des flacons en pyrex de 100 mL, fermés par un septum en téflon, contenant 20 mg de CA et 50 mL de solution de PHE. Les rapports solide/liquide utilisés ont été choisis par rapport au K_d ($L.Kg^{-1}$) déterminé suite à des essais d'adsorption préliminaires (Tableau 5). Ces essais ont été réalisés dans des tubes de 10 mL, fermés par un septum en téflon, contenant 180 mg de matériaux et 6 mL de solution de PHE ($300 \mu g.L^{-1}$).

	Pz	PzF	CA
Kd (L.Kg-1)	0,74	0,022	0,0006

Tableau 5. Coefficient de partage solide/liquide ($K_d L.Kg^{-1}$) des matériaux testés

Les solutions-mères de PHE, marqué ou non au carbone 14, ont été réalisées dans du méthanol (Carlo-Erba). Les solutions de PHE, utilisées lors des essais d'adsorption, ont été préparées par dilution des solutions-mères dans des solutions de $CaCl_2 10^{-3} M$, de sorte que :

- (i) La concentration en méthanol soit inférieure à 2,5 %
- (ii) La concentration initiale en phénanthrène soit comprise entre 20 et $400 \mu g.L^{-1}$

Afin de tenir compte de l'adsorption du phénanthrène sur les parois des flacons, les solutions de $CaCl_2$ contaminées sont mises en contact avec le flacon pendant 24h avant d'ajouter les matériaux. La mesure de l'activité en solution après 24h de contact permet de déterminer la concentration réelle en phénanthrène au début de l'isotherme. Les matériaux sont laissés pendant 48h en contact avec la solution de phénanthrène, temps nécessaire pour atteindre l'équilibre. Ce temps d'équilibre a été établi grâce à des expériences préliminaires de cinétique réalisées en utilisant une solution de phénanthrène à $400 \mu g.L^{-1}$ (10 mL pour Pz et PzF, 50 mL pour CA) et 2 g de Pz, 0,5 de PzF ou 20 mg de CA.

La concentration du phénanthrène en solution est estimée par des mesures de l'activité ^{14}C -PHE par comptage en scintillation liquide (CSL) en mélangeant 1 mL de la solution aqueuse avec 10 mL de liquide à scintillation (Ultimagold[®], Perkin Elmer).

Les résultats des isothermes ont été traités par un modèle de Freundlich qui permet de décrire l'adsorption et de comparer rapidement les différents matériaux testés (Simon et Meggyes 2000).

$$Q_{\text{ads}} = K_f \times C_{\text{eq}}^n$$

Q_{ads} : Quantité de phénanthrène adsorbé ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ matériaux)

C_{eq} : Concentration de phénanthrène à l'équilibre ($\mu\text{g/L}$)

K_f : Coefficient d'adsorption de Freundlich ($\mu\text{g.kg}^{-1}/(\mu\text{g.L}^{-1})$)

n : Exposant représentant l'hétérogénéité des sites de fixation

Les triplicats réalisés avec la concentration la plus élevée ont servi pour les essais de désorption. Pour cela, la moitié du volume de solution est remplacée par une solution de CaCl_2 10^{-3} M ne contenant pas de phénanthrène. Après 48h de contact, la solution est à nouveau remplacée pour moitié et laissée encore pendant 48h en contact avec le CA. La solution est renouvelée encore deux fois. Avant chaque renouvellement, l'activité en solution est mesurée afin d'évaluer la quantité de phénanthrène désorbée.

2.2.2.2 Isothermes d'adsorption bactérienne sur le charbon actif

Les isothermes d'adsorption des 5 souches bactériennes sur le charbon actif ont été réalisées en batch. Chaque batch contient 3 mL d'une solution saline (NaCl $8,5 \text{ g.L}^{-1}$), 5×10^7 bactéries. mL^{-1} (NAH1, MATE3, MATE7, MATE10 ou MATE12) et de 1 à 100 mg de CA (1, 2, 6, 10, 20, 40, 75, 100 mg). Chaque traitement est réalisé en triplicat. Les batchs sont mis en agitation pendant une heure. Après ce délai, 1 mL de la solution est prélevé afin d'évaluer le nombre de bactéries en suspension par comptage sur cellule de Thoma. Le nombre de bactéries adsorbées est obtenu par différence entre le nombre de bactéries initial apporté et celui en suspension après une heure de contact. Le temps d'incubation a été déterminé après des essais d'adsorption en cinétique réalisés dans des batch contenant 50 mL d'une solution saline (NaCl $8,5 \text{ g.L}^{-1}$), 5×10^6 bactéries. mL^{-1} (NAH1) et 50 mg de CA (Figure 6).

Ces isothermes ont également été réalisées avec du charbon actif recouvert par du phénanthrène (CAPHE). Deux rapports solide / liquide ont été utilisés pour préparer deux CA recouverts notés par la suite CAPHE1 et CAPHE2. Pour la préparation du CAPHE1, 800 mg de charbon actif sont mis en contact avec 2 L d'une solution aqueuse de phénanthrène (BH 3,27 g.L⁻¹, PHE 1mg.L⁻¹) pendant 48 heures sous agitation. Dans le cas de CAPHE2 le mode opératoire est identique avec un rapport solide / liquide de 150 mg pour 2L de solution aqueuse de PHE (BH 3,27 g.L⁻¹, PHE 1mg.L⁻¹). Après filtration sur papier filtre sans cendre, le CA est séché à température ambiante sous flux laminaire. Ceci permet d'obtenir un CA sur lequel une quantité plus importante de PHE s'est adsorbé.

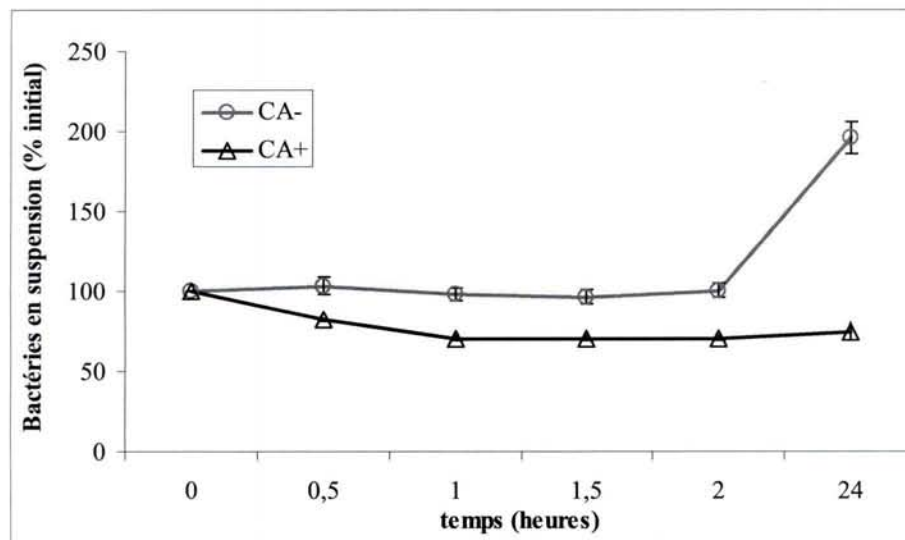


Figure 6. Cinétique d'adsorption de la souche bactérienne NAH1 sur du charbon actif, CA- traitement sans charbon actif, CA+ traitement avec charbon actif, moyenne et erreur standard (n=3).

A partir des données de porosimétrie au mercure, il est possible d'estimer la surface de CA accessible aux bactéries (voir chapitre 2.3.1.2). En estimant la surface d'une bactérie à 1 μm^2 , il est possible de calculer un taux de recouvrement. Celui-ci peut être modélisé grâce à un modèle de type Freundlich :

$$\theta = K_f \times C_{eq}^n$$

θ : Taux de recouvrement du charbon actif par les bactéries

C_{eq} : Concentration des bactéries en suspension à l'équilibre (bactéries.mL⁻¹)

K_f : Coefficient d'adsorption de Freundlich

n : Exposant représentant l'hétérogénéité des sites de fixation

2.2.3 Biodégradation du phénanthrène : essais en batch

Les objectifs de ces essais étaient de suivre la minéralisation du phénanthrène en fonction :

- ↳ de la présence ou non de matériaux
- ↳ des propriétés de l'inoculum bactérien

2.2.3.1 Essais réalisés avec du phénanthrène marqué

Deux expériences utilisant du phénanthrène marqué ont été réalisées au cours de cette étude. La première consistait à tester l'effet des trois matériaux sélectionnés sur la dégradation du phénanthrène par une souche bactérienne (NAH1). La seconde consistait à comparer la capacité minéralisatrice en présence ou en absence de CA de deux souches bactériennes (NAH1 et MATE10) et à réaliser un bilan du phénanthrène dans le système.

La première expérience de minéralisation du phénanthrène a été réalisée dans des batchs contenant 50 mL d'une solution minérale (BH, 3,27 g.L⁻¹), une source de phénanthrène (1 g.L⁻¹, <1 % de ¹⁴C-PHE), une souche bactérienne dégradante NAH1 (5,5x10⁶ bactérie.mL⁻¹) et un des matériaux testés Pz (10g), PzF (1g) et CA (50mg) en triplicats. Des témoins abiotiques et sans matériaux ont été réalisés. Après stérilisation des flacons contenant 50 mL de solution minérale, le phénanthrène (marqué ou non) est apporté sous forme d'une solution méthanolique telle que la concentration finale en méthanol soit inférieure à 2,5 %. De la même manière que lors des essais d'adsorption du PHE sur les trois matériaux, le flacon est agité pendant 24h avant d'ajouter les matériaux. La mesure de l'activité en solution (1 mL de la solution avec 10 mL de liquide à scintillation – Ultimagold[®], Perkin Elmer) après 24h de contact permet de déterminer la concentration réelle en phénanthrène en solution au début de l'expérience. Les matériaux sont alors ajoutés et laissés pendant 48h en contact avec la solution de phénanthrène, temps nécessaire pour atteindre l'équilibre solide/solution. L'inoculum bactérien est alors apporté, ce qui constitue le début (t₀) de l'expérience. Le suivi de la minéralisation du PHE se fait par comptage en scintillation du ¹⁴C-CO₂. Le ¹⁴C-CO₂ est piégé par bullage dans 10 mL de soude (0,4 N), après avoir été chassé du réacteur. Après 45 minutes de bullage, l'activité piégée est mesurée en mélangeant 1 mL de soude avec 10 mL de liquide à scintillation. Le suivi du nombre de bactéries en suspension au cours de l'incubation se fait par comptage direct sur cellule de Thoma d'une aliquote de 20 µL de solution.

Au cours de la deuxième expérience, un bilan complet du phénanthrène a été réalisé. Les batchs contenaient 50 mL d'une solution minérale (BH, 3,27 g.L⁻¹), une source de phénanthrène (1 mg.L⁻¹, <1 % de ¹⁴C-PHE), une souche bactérienne dégradante, NAH1 ou MATE10 (5,5x10⁶ bactérie.mL⁻¹), et 20 mg de CA. Des témoins abiotiques et sans CA ont été réalisés. Tous les traitements ont été menés en triplicats. Le choix des deux souches bactériennes utilisées est discuté dans le chapitre 3.4.2. Le protocole utilisé est le même que lors de la première expérience. Le bilan du phénanthrène au cours de la cinétique de minéralisation se fait grâce au suivi du ¹⁴C-PHE en solution, du ¹⁴C-PHE adsorbé sur le CA et du ¹⁴C-PHE minéralisé sous forme de ¹⁴C-CO₂. Pour cela, 3 flacons ont été sacrifiés à chaque prélèvement, à la fréquence de un prélèvement par semaine. Pour le suivi du ¹⁴C-CO₂, la fréquence de mesure est de 2 par semaine. Le suivi du phénanthrène en solution se fait par comptage de l'activité en solution (1 mL de la solution avec 10 mL de liquide à scintillation – Ultimagold[®], Perkin Elmer). Le suivi du ¹⁴C-CO₂ a été réalisé comme décrit précédemment. Le phénanthrène adsorbé sur CA est extrait en mettant en contact une quantité (entre 10 et 20 mg) connue de CA avec 20 mL de dichlorométhane sous agitation pendant 4h. L'activité en solution est mesurée de la même manière que pour le dosage du phénanthrène en solution. L'évolution du recouvrement du CA par NAH1 et MATE10 a été étudiée grâce à des observations en microscopie confocale (voir chapitre 2.3.4).

2.2.3.2 Essais réalisés avec du phénanthrène non marqué

La comparaison des 5 souches bactériennes vis-à-vis de la biodégradation du phénanthrène en présence ou en absence de CA a été réalisée avec du PHE non marqué. Ces essais ont été réalisés dans des batchs contenant : 50 mL d'une solution minérale (BH 3,27 g.L⁻¹, Difco), une solution de phénanthrène (1mg.L⁻¹) et 10⁶ bactéries.mL⁻¹. Pour chaque souche, 6 batchs ont été réalisés, dont 3 ont reçu 20 mg de charbon actif stérile. Des témoins abiotiques (sans inoculum) avec ou sans charbon actif ont été réalisés. Après stérilisation des flacons contenant 50 mL de solution minérale, le phénanthrène est apporté sous forme d'une solution méthanolique telle que la concentration finale en méthanol soit inférieure à 2,5 %. Le suivi de la minéralisation se fait par dosage du C-CO₂. Régulièrement, 10 mL d'atmosphère des flacons sont prélevés avec une seringue, le CO₂ présent est dosé par spectrophotométrie infrarouge avec un spectromètre IR Binos 1004 (radiation IR à 2325,6 cm⁻¹). La concentration en CO₂ mesurée est exprimée en % de C minéralisé à partir du C apporté. Parallèlement au

suivi de la minéralisation du phénanthrène, des batchs contenant du charbon actif et une des 5 souches bactériennes ont été préparés dans les mêmes conditions. En fin d'incubation, des observations en microscopie confocale des grains de CA ont été réalisées afin d'observer les interactions bactéries / PHE / CA.

2.2.4 Essais en colonne

Les études en colonnes avaient pour objectif d'étudier la capacité de fixation du phénanthrène et des bactéries sur le charbon actif dans un système dynamique, et les conséquences sur la biodégradation. Le modèle colonne peut être considéré comme un réacteur ouvert. Il permet de travailler sur des volumes plus importants de matériaux et de solution. De plus, les conditions expérimentales sont plus proches des conditions *in situ* que les essais en batch.

2.2.4.1 Préparation des colonnes

Le choix du type de colonne s'est fait par rapport à différentes contraintes techniques :

- ↳ Le dimensionnement de la colonne, en particulier son diamètre, devait tenir compte de la granulométrie des grains de CA (0,85 - 1 mm) (M.O. Simonot, communication personnelle)
- ↳ L'adsorption aspécifique du phénanthrène sur le matériau devait être limitée

Deux colonnes ont été utilisées au cours de cette étude. Elles ont été fabriquées dans les ateliers du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) de Nancy. Elles ont été réalisées en acier inoxydable. La partie interne de la colonne mesure 10 cm de hauteur pour un diamètre de 2 cm. En entrée et en sortie de colonne, un fritté en acier inoxydable (porosité 50 μm) permet une bonne diffusion du flux entrant sur toute la surface de la colonne et limite la sortie de particules. Afin de limiter l'adsorption du phénanthrène dans le système, les composants en acier inoxydable ou en verre ont été privilégiés au niveau des connectiques, des tubes et des flacons utilisés. La Figure 7 montre le dispositif expérimental lors de l'utilisation d'une pompe HPLC pour l'alimentation.



Figure 7. Dispositif expérimental utilisé lors des essais en colonne. De gauche à droite : flacon en verre pour l'alimentation, pompe HPLC, Colonne en acier inoxydable, flacon de récupération en verre.

Le remplissage des colonnes se fait à sec avec environ 10 g de CA. Afin de stériliser le dispositif, chaque colonne est autoclavée (20 min, 110°C, 0,5 bar). Avant le début de l'expérience, un flux de CO₂ est injecté dans la colonne afin de remplacer l'atmosphère entre les grains. La colonne est alors mise en eau avec une solution minérale (BH 3,27 g.L⁻¹). L'écoulement dans la colonne se fait de bas en haut au moyen d'une pompe HPLC (Beckman 110B solvent module delivery) ou d'une pompe FPLC (Amersham, Äkta FPLC system) à un débit de 0,2 mL.min⁻¹ afin d'obtenir une bonne saturation de la colonne. La mise en eau se fait sur une période de 24h avec une augmentation progressive du débit jusqu'à 1 mL.min⁻¹ au cours des dernières heures. Le volume d'eau dans la colonne est alors déterminé par pesée. L'utilisation d'une pompe HPLC ou FPLC permet d'obtenir un débit constant sur une longue période d'utilisation. De plus, le colmatage partiel de la colonne peut être suivi en contrôlant l'augmentation de la pression au niveau de la pompe.

2.2.4.2 Principe des expériences en colonnes

Deux protocoles expérimentaux ont été utilisés (Figure 8) avec deux souches bactériennes, NAH1 et MATE10. Le protocole A a permis d'évaluer le temps de rétention du phénanthrène dans la colonne et l'impact de la présence de bactéries sur l'évolution de la concentration de PHE en sortie de colonne. Dans ce cas, l'inoculum microbien est apporté après saturation de la colonne par le PHE (Figure 8). Le protocole B avait pour objectif

d'évaluer l'effet de l'inoculation sur le temps de sortie de PHE de la colonne. La colonne est alors saturée en bactéries avant les apports de PHE. Ces essais ont également permis d'évaluer le temps de saturation de la colonne en bactérie en présence de CA ou de CAPHE.

La solution d'alimentation de la colonne est préparée et stérilisée par autoclavage dans des flacons de 5 litres en verre. L'apport du PHE, dans la solution d'alimentation, se fait au moyen d'une solution stock préparée dans du méthanol (1 g.L^{-1}). Une boucle d'injection (210A Sample Injection Valve, Beckman pour la HPLC, INV 907, Amersham pour la FPLC) permet d'apporter l'inoculum bactérien par injections des successives (10^9 bactéries par injection). Le suivi de l'élution des bactéries se fait par spectroscopie UV à 254 nm, en comparant les profils d'élution témoins des bactéries, obtenus en absence de colonne, à ceux obtenus suite à l'injection des bactéries dans la colonne selon un protocole adapté de (Méline 1995). Les différences obtenues au niveau de l'aire des pics d'élution sont proportionnelles à la quantité de bactéries adsorbées. Les injections ont été stoppées lorsque le profil d'élution était équivalent au témoin. En sortie de colonne, la solution est récupérée dans des flacons stériles puis stockée à 4°C. Le suivi du phénanthrène se fait par extraction liquide/liquide puis dosage par HPLC. Le suivi de la densité bactérienne se fait par comptage en cellule de Thoma.

En fin d'expérimentation, le charbon actif est poussé hors de la colonne au moyen d'un piston en verre. La carotte obtenue a été découpée en trois sections (Figure 9) de dimension similaire (environ 3 à 3,5 cm). Dans chaque section différentes analyses ont été réalisées :

- ↳ dosage du phénanthrène en solution par extraction liquide/liquide
- ↳ dosage du phénanthrène adsorbé sur le CA par extraction ASE (Accelerated Solvent Extraction) puis dosage par GC-FID
- ↳ dénombrement des bactéries adsorbées sur le CA (voir chapitre 2.2.1)

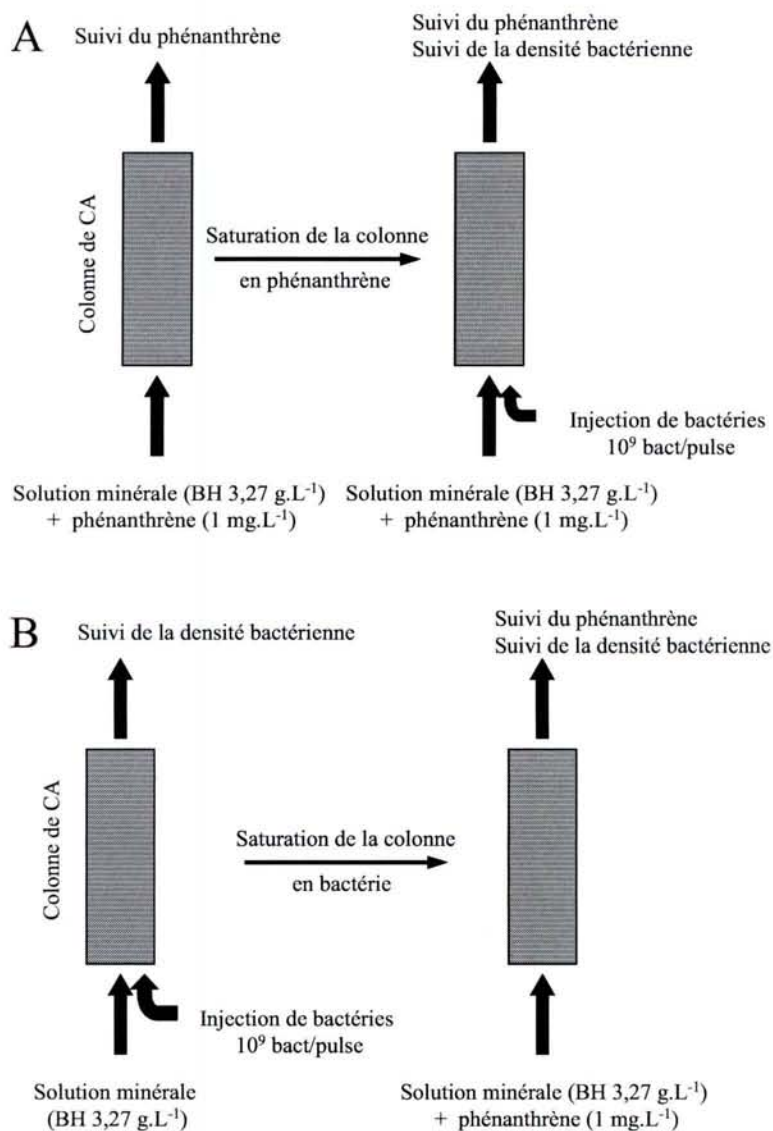


Figure 8. Schéma des essais en colonne réalisés selon deux protocoles, saturation de la colonne en PHE puis inoculation (A) ou inoculation de la colonne puis injection du PHE (B).

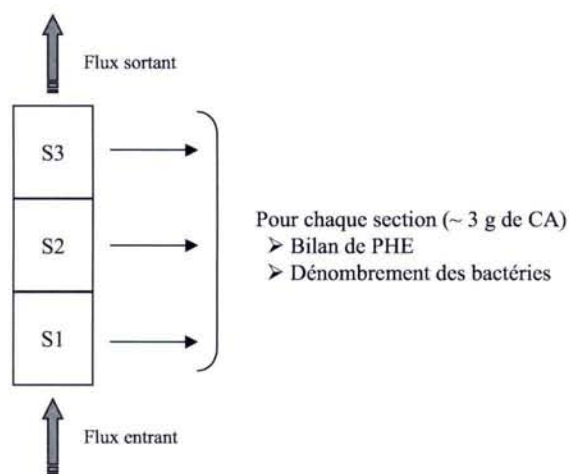


Figure 9. Schéma du bilan réalisé en fin d'expérience en colonne

2.3 Analyses

2.3.1 Caractérisation de la structure des matériaux

Les mécanismes d'adsorption du phénanthrène et des bactéries sur une surface solide sont influencés par la surface accessible développée à l'interface solide / solution et également par la structuration de la porosité. Ces deux paramètres ont été étudiés par des mesures de surface spécifique BET et de porosimétrie mercure.

Les mesures de surface spécifique ont été réalisées au Laboratoire Environnement et Minéralurgie (LEM) à Vandoeuvre-les-Nancy. La caractérisation de la distribution des tailles et volumes de pores a été réalisée au Laboratoire Environnement, Géomécanique et Ouvrages (LAEGO) à Vandoeuvre-les-Nancy

2.3.1.1 Mesures de surfaces spécifiques

Les surfaces spécifiques du CA et du CAPHE ($S_{\text{tot}} \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) ont été déterminées par des adsorptions multicouches de molécules d'azote à 77°K sur le solide (théorie de Langmuir

généralisée par Brunauer, Emmet et Teller, BET). La détermination de la distribution poreuse repose sur la loi de Kelvin basée sur la condensation du gaz à la surface d'un pore cylindrique. Les caractéristiques des micropores permettent de déterminer la surface spécifique hors microporosité ($S_{\text{ext}} \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). Elles sont déterminées à partir des isothermes d'adsorption des molécules d'azote par le modèle du t-plot.

2.3.1.2 Mesures de porosimétrie au mercure

Les mesures de porosimétrie au mercure permettent de connaître la porosité totale du solide ainsi que la distribution des pores dont le rayon est compris entre 36 nm et 100 μm . La porosimétrie mercure repose sur le principe qu'un liquide non-réactif, non-mouillant, ne pénètre pas dans les pores à moins de lui appliquer une forte pression. La relation mathématique diamètre des pores / pression appliquée, est donnée par l'équation de Washburn. La porosité totale (P), exprimée en %, représente le volume de vide sur le volume total. La distribution de rayons de pores permet de calculer le volume occupé par la mésoporosité (V_{me} , 3,6-50 nm de rayon, $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$), la macroporosité (V_{ma} , >50 nm de rayon, $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$) et V_b que l'on peut considérer comme le volume de pores accessibles aux bactéries (V_b , >1 μm de rayon, $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$).

A partir des données de porosimétrie au mercure, il est possible de calculer une surface accessible aux bactéries. Deux méthodes de calcul ont été utilisées en fonction de la répartition des pores. Dans la première méthode, les pores du CA ont été assimilés à des demi-sphère réparties sur l'ensemble de la surface du CA. Connaissant pour chaque classe de pores le volume d'un pore et le volume total occupé par la classe de pores considérée, il est possible d'estimer le nombre de pores dans chaque classe de pores. La surface développée par chaque classe de pores est estimée en multipliant le nombre de pores par la surface de chaque pore. La surface accessible aux bactéries est obtenue en faisant la somme des surfaces développées pour les pores de rayon supérieur à 1 μm . Dans la deuxième méthode, les pores sont assimilés à une succession de demi-sphère. La surface calculée pour chaque classe de pores i est obtenue en retirant, à la surface du pore i , la surface correspondant à l'intersection entre le pore i et le pore $i-1$. La surface accessible aux bactéries est obtenue en faisant la somme des surfaces développées pour les pores de rayon supérieur à 1 μm .

2.3.2 Analyses organiques

2.3.2.1 Extraction liquide/liquide

Afin de doser le phénanthrène présent dans une solution aqueuse (notamment dans les effluents en sortie de colonnes), une extraction liquide/liquide est nécessaire. Pour cela, 100 ml d'échantillon aqueux, préalablement acidifié (1 mL HCl 12N), sont mélangés avec 50 mL de dichlorométhane (Carlo-Erba >99%) puis agités pendant 3 minutes dans une ampoule à décanter. L'extraction est réalisée deux fois et les deux fractions organiques sont rassemblées puis concentrées grâce à un évaporateur rotatif jusqu'à un volume final de 1 mL. Le phénanthrène est alors dosé par HPLC.

Dans le cas des essais en colonne, le protocole a été adapté pour des volumes d'échantillons aqueux plus faibles en conservant le rapport échantillon aqueux / solvant organique.

2.3.2.2 Extraction du phénanthrène par ASE

L'appareil utilisé pour l'extraction du phénanthrène adsorbé sur CA est un extracteur ASE (Accelerated Solvent Extraction) 200 (Dionex). Une quantité connue de charbon actif est introduite dans des cellules en métal. Au cours de l'extraction le sédiment est traversé par un flux de solvant organique chaud (héxane, Carlo-Erba). Le solvant (50 mL) est injecté par l'une des extrémités de la cellule et traverse toute la longueur de celle-ci. Le solvant est ensuite éjecté par du solvant frais puis de l'azote. L'extraction est répétée deux fois pour chaque échantillon. Les extraits sont séchés sous flux d'azote puis regroupés après solubilisation dans un volume connu de dichlorométhane (Carlo-Erba). Le phénanthrène est analysé par GC-FID

2.3.2.3 Dosage du phénanthrène par HPLC

Le chromatographe utilisé est un modèle Hewlett-Packard série 1050 couplé à un détecteur 3D à fluorescence HP 1100 (Hewlett-Packard). 20 µL d'échantillons sont injectés manuellement dans une colonne supelcosil LC-PAH (15cm*4,6mm*5mm) (Supelco). L'élution se fait en mode isocratique acétonitrile/eau (80/20) à un débit de 1 mL.mn⁻¹. Le

temps de rétention du phénanthrène est de 4 minutes. Le phénanthrène est détecté par absorption UV à 254 nm.

2.3.2.4 Dosage du phénanthrène par GC-FID

Une quantité connue de standard interne (n-eicosane₂₀) est ajoutée à l'échantillon. Le chromatographe utilisé est un HP 5890A Gas Chromatograph. Les prises d'essais d'échantillons de 1 µL sont injectées en mode splitless (280°C). La séparation est effectuée en programmation de température avec une colonne capillaire DB5MS J&W Scientific (60m*0,25 mm*0.1 µm) initialement à 30°C avec une montée en température de 30 à 130 °C à raison de 15°C.min⁻¹ puis de 130 à 320°C (3°C.min⁻¹). Le gaz vecteur utilisé est l'hélium à 1 mL.min⁻¹ sous 25 psi. La détection des composés se fait par ionisation de flamme (Air / hydrogène) à 325°C.

2.3.3 Caractérisation des propriétés des membranes bactériennes

L'adhésion bactérienne sur un solide implique des interactions de type hydrophobe et électrostatique (Rijnaars *et al.* 1996). Pour caractériser les propriétés des membranes bactériennes qui conditionnent leur adhésion, différents outils ont été utilisés :

- ↳ Le **test MATH** : détermination de l'affinité d'une membrane bactérienne vis-à-vis d'une surface hydrophobe.
- ↳ Le **titrage potentiométrique acido-basique** : détermination des différents domaines d'acidité.
- ↳ La mesure du **potentiel électro-cinétique (ζ)** : détermination des charges de surfaces des bactéries.

2.3.3.1 Adhésion microbienne sur un hydrocarbure (test MATH)

L'hydrophobicité d'une surface bactérienne joue un rôle prépondérant dans sa capacité à adhérer à une surface, en particulier si celle-ci présente des zones hydrophobes comme dans le cas du CAPHE. Le test MATH est couramment utilisé afin de mesurer l'affinité d'une souche bactérienne pour une surface hydrophobe (Busscher *et al.* 1995, Guellil *et al.* 1998, Palmgren *et al.* 1998).

Protocole du test MATH

Le protocole utilisé est issu de celui décrit par Jenkins et Lion (1993). Deux hydrocarbures ont été utilisés au cours de cette étude, le toluène (hydrocarbure aromatique) et le n-hexadécane (hydrocarbure aliphatique). 2,4 mL d'une solution saline ($\text{NaCl } 8,5 \text{ g.L}^{-1}$) contenant 10^8 bactéries.mL⁻¹ sont mis en contact avec 100, 200 ou 400 μL d'héxadécane ou de toluène (Sigma- Aldrich, 98 %) dans des flacons en verre de 4mL. Après 15 minutes de contact à 28°C, les dispositifs sont agités pendant 2 minutes grâce à un vortex. Afin de séparer les phases aqueuses et organiques, les dispositifs sont placés pendant 15 minutes dans une chambre à 28°C. Après ce délai, 1 mL de la phase aqueuse est prélevé afin d'évaluer le nombre de bactéries par comptage sur cellule de Thoma. La différence entre le nombre de bactéries dans la phase aqueuse avant et après mise en contact avec l'hydrocarbure permet de calculer le pourcentage de bactéries ayant adhéré à la surface hydrophobe. Cette valeur traduit l'affinité de chaque souche vis-à-vis d'une surface hydrophobe.

2.3.3.2 Titrage potentiométrique acido-basique (TPH)

La technique de titrage potentiométrique acido-basique permet d'étudier et de caractériser les propriétés électrostatiques de surface de structures minérales (Angove *et al.* 2002) ou de membranes biologiques (Briones-Gallardo 2002). Les résultats obtenus lors d'un TPH avec un solide (organique ou minéral) sont comparés à ceux du témoin, la différence étant attribuable à la réactivité de l'échantillon. L'exploitation des données se fait en utilisant différentes méthodes : la fonction de Gran pour la détermination des classes d'acidité, l'équation d'Henderson-Hasselbach pour la détermination de leur pKa respectif, la procédure TDIS (Titration Derivative Isotherm Summation) qui permet également de déterminer des domaines d'affinité protonique.

Protocole de réalisation du TPH

Un TPH se déroule en deux étapes, tout d'abord la réalisation d'un TPH témoin puis le titrage de l'échantillon. La TPH témoin permet de s'assurer de la qualité de la soude, utilisée lors du titrage en particulier son éventuelle carbonatation, et de la linéarité de l'électrode pH. Les valeurs obtenues servent à l'exploitation des données issues du TPH de l'échantillon.

Le titrage se fait dans un réacteur en verre de 100 mL, hermétique, thermostaté à 25°C et homogénéisé grâce à un barreau magnétique. La partie supérieure du réacteur présente quatre ouvertures permettant le passage du titrant, du courant d'azote, de l'électrode pH et de

la sonde de température. Le TPH est réalisé dans 40 mL d'une solution de NaClO_4 (0,125 M, Merck) comme électrolyte support. Le pH de la solution est amené à 2,7 grâce à une solution d'acide perchlorique (HClO_4 0,058 M, Prolabo). En parallèle, le courant d'azote permet de dégazer la solution et d'éliminer le dioxyde de carbone. L'azote utilisé pour le barbotage est préalablement décarbonaté en passant dans une solution de soude 0,1 M. Le barbotage dans le réacteur de titration se fait pendant au moins 20 minutes, temps nécessaire pour éliminer toute trace de dioxyde de carbone et s'assurer de la stabilité du pH ($1 \text{ mV} \cdot \text{mn}^{-1}$). Le titrant utilisé est une solution de soude 0,05 M décarbonatée. L'ajout de la soude (titrant) se fait grâce à une burette de précision (ABU901, Radiometer, Copenhague). Le pH est mesuré au moyen d'une électrode combinée de Ross (Orion 81-02, Boston, MA). La solution interne KCl de l'électrode a été remplacée par une solution saturée de NaCl 4 M afin d'éviter les risques de précipitation de KClO_4 à l'interface électrode/solution. Tous les TPH ont été réalisés avec un pH initial de 2,7 et jusqu'à pH 11.

L'ajout de soude et l'acquisition des données au cours du titrage sont gérés par un système d'acquisition automatique des données développé au laboratoire et adapté de celui décrit par Naja (2001). Ce système permet de moduler l'ajout de soude, de 10 à 200 μL , suivant un critère établi à partir de la mesure de la dérivée du potentiel souhaitée après un ajout de titrant grâce au calcul de la dérivée moyenne sur les 3 derniers points d'équilibre enregistrés.

Avant le titrage d'une suspension bactérienne, il est nécessaire de conditionner la biomasse en milieu acide (Briones-Gallardo 2002, Yee et Fein 2001). Cette étape permet la solubilisation des cations et anions présents à la surface de la membrane bactérienne ainsi que la reprotonation des sites fonctionnels. Après les différentes étapes de rinçage de l'inoculum (voir chapitre 2.2.1), le culot bactérien est remis en suspension dans une solution de NaClO_4 0,1 M à pH 2 et placé à 4°C pendant une nuit. La suspension est alors rincée par centrifugation en présence de NaClO_4 (0,1 M) à pH 7. La préparation du réacteur de titration se fait de la même manière que pour le témoin. L'inoculum bactérien est apporté dans 1 mL de solution de telle sorte que la concentration finale en bactéries soit comprise entre $5 \cdot 10^7$ et $2 \cdot 10^8$ bactéries. mL^{-1} . Le TPH est réalisé dans les mêmes conditions que pour le témoin. Une fois le titrage terminé, la solution est filtrée sur membrane à $0,22 \mu\text{m}$. Le filtre est séché pendant une nuit à 105°C afin d'évaluer la matière sèche.

Exploitation des données

Les méthodes de Gran et d'Henderson-Hasselbach sont décrites en annexe 1.

La méthode de Gran permet de décrire la fonction F_G qui relie le pH au volume ajouté durant le titrage de plusieurs réactions, parmi lesquelles la réaction de neutralisation entre un acide fort et une base forte, un acide faible (mono, di ou poly acide) et une base forte, les réactions de complexation, de précipitation ou d'oxydo-réduction. Les tangentes respectives à F_G dans les domaines très acides et basiques permettent de différencier trois régions dans l'ensemble de la courbe de titrage, délimitées par une première zone d'acidité forte notée AF ($\text{pH} < 4$) attribuable à des acidités minérales (phosphorique ou sulfonique) ou organiques (groupement carboxylique fixé à un noyau aromatique), une deuxième zone d'acidité faible notée Af ($4 < \text{pH} < 7$) attribuable aux acidités polycarboxyliques ou à des groupements acides aminés des protéines et une dernière zone relative à des acidités très faibles notée Atf ($\text{pH} > 7$) assignées aux groupements acides aminés, à la deuxième ionisation du groupement phosphate ou à l'expression des hydroxyles des groupements phénoliques. Il est donc possible d'évaluer les contributions relatives (%) ou absolues (meq.g^{-1}) des 3 types d'acidités dans l'échantillon.

La méthode d'Henderson-Hasselbach permet de calculer les différentes constantes d'ionisation sous forme de pKa moyen pour chacune des deux contributions Af et Atf à partir des courbes de titrage. Ces constantes d'acidité moyennes sont indicatrices avant tout d'une distribution des sites acides et ne doivent pas être considérées en valeur absolue ou comme des grandeurs thermodynamiques.

La procédure TDIS (Thomas et al. 2002) permet de déterminer différents domaines d'affinité protonique grâce à la courbe de titrage. Le principe est celui utilisé pour l'adsorption des gaz. La courbe de titrage est assimilée à une isotherme d'adsorption d'ions hydroxyles. La surface de l'échantillon est composée de différents domaines indépendants ayant une affinité spécifique vis-à-vis de l'ion hydroxyle. La dérivée de la courbe de titrage est décomposée en plusieurs isothermes d'adsorption locales théoriques correspondant à un domaine spécifique.

2.3.3.3 Potentiel électrocinétique

La surface d'une membrane bactérienne présente de nombreuses charges électrostatiques. La distribution de ces charges ainsi que leur nombre varie selon le pH de la solution (protonation/déprotonation des sites de surface). La microélectrophorèse consiste à mesurer, à l'aide d'un microscope et d'un système d'acquisition d'image, la vitesse et la direction de migration des particules (ici des bactéries) sous l'effet d'un champ électrique. Le rapport entre la vitesse de migration et le champ électrique appliqué est appelé mobilité électrophorétique, il varie en fonction du pH. L'équation de Smoluckowski permet de calculer le potentiel ζ (mV) en fonction de paramètres tels que la taille des particules ou la température.

Protocole de la mesure du potentiel électrocinétique

L'appareillage utilisé est un Zetaphotometer III (Sephy, CAD instrumentation) comportant une cellule de mesure et une caméra numérique permettant l'acquisition d'une séquence lors de l'application d'un champ électrique. Les mesures ont été réalisées dans une solution de NaCl 0,125 M, contenant au moins 10^7 bactéries.mL⁻¹. Des ajouts de HCl ou de NaOH ont servi à ajuster le pH des suspensions. La préparation des inoculums bactériens a été réalisée de la même manière que lors du TPH, en particulier le conditionnement de la biomasse. En effet, des mesures effectuées avec NAH1, avec ou sans conditionnement, montrent un décalage dans le profil du potentiel zêta (Figure 10).

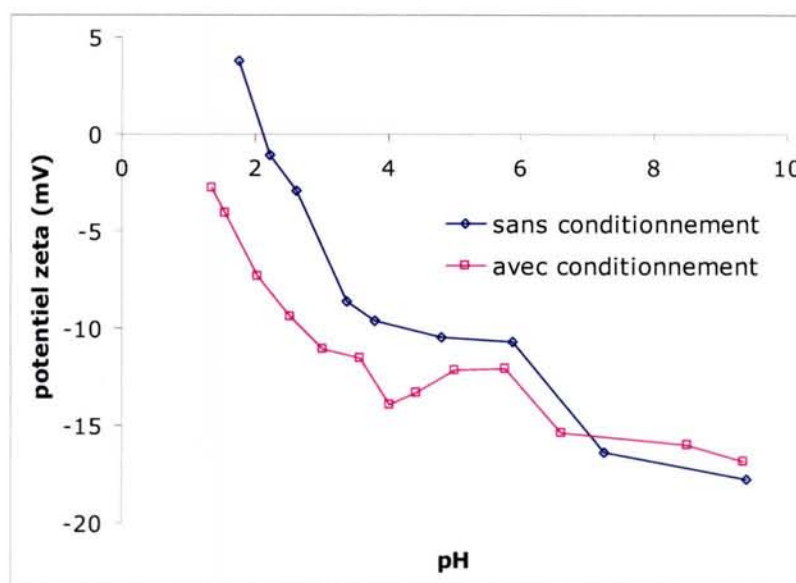


Figure 10. Impact du conditionnement de l'inoculum (NAH1) sur l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH.

2.3.4 Observations en microscopie confocale

L'utilisation de la microscopie confocale a permis de visualiser et d'étudier les interactions bactéries-phénanthrène-charbon actif.

Principe et généralités

Les images en microscopie à fluorescence classique ont une perte de résolution due à l'excitation des fluorochromes se situant hors du plan focal. En effet, les fluorochromes sont excités par le laser sur toute l'épaisseur de la préparation, ce qui se traduit par une image contaminée par un bruit de fond. L'objectif de la microscopie confocale à balayage laser (CLSM pour confocal laser scanning microscopy) est d'éliminer la lumière provenant des plans défocalisés qui parasitent le plan focal.

L'excitation des fluorochromes se fait par un laser. Les plus couramment utilisés sont les lasers argon/krypton (488 nm et 568 nm) et hélium-néon (633 nm). La préparation est balayée par le laser point par point suivant l'axe des X et l'axe des Y grâce à des miroirs. La fluorescence est ré-émise dans les trois dimensions et dans les différents plans. Un pinhole (trou d'épingle) est présent à l'entrée du photodétecteur pour ne récupérer que les photons provenant du point illuminé. Les photons de fluorescence sont captés par le photodétecteur pour être amplifiés et transformés en signal électrique dont l'intensité est proportionnelle au nombre de photons reçus. Ce signal électrique est ensuite numérisé en un niveau de gris (valeur du signal compris entre 0 et 255). La CLSM présente de nombreux avantages par rapport à la microscopie à fluorescence :

- ↳ Acquisition de séries de sections optiques permettant la reconstruction 3D
- ↳ Elimination du signal de fluorescence provenant d'autres plans focaux grâce au pinhole
- ↳ Augmentation de la résolution latérale et axiale
- ↳ Observations simultanées de différentes sondes fluorescentes

Préparation des échantillons

Deux méthodes de marquage ont été utilisées pour observer les interactions bactéries-phénanthrène-charbon actif : Marquage LIVE/DEAD et marquage à l'acridine orange.

Les bactéries à la surface des grains de CA ont été observées par un double marquage fluorescent des cellules vivantes ou mortes grâce au kit LIVE/DEAD BacLight (molecular Probes). Ce kit contient deux fluorochromes le Syto[®] 9 et l'iodure de propidium. Le Syto[®] 9 se fixe sur toutes les bactéries alors que l'iodure de propidium ne peut se fixer que sur les bactéries mortes. Les cellules vivantes fluorescent dans le vert alors que les cellules mortes fluorescent dans le rouge. Le protocole utilisé est celui fourni par le fabricant : un grain de CA est mis en contact avec 200 µL de NaCl (8,5 g.L⁻¹) et 200 µL de réactif 2X du kit pendant 15 minutes. L'expérience est réalisée en évitant au maximum l'exposition directe de la préparation à la lumière. En effet, les fluorochromes sont sensibles au phénomène de perte de fluorescence qui peut réduire l'intensité de la fluorescence suite à une exposition prolongée à la lumière.

Le marquage à l'acridine orange a été utilisé pour visualiser les biofilms. Le protocole utilisé a été décrit par Moller *et al.* (1996). Un ou deux grains de CA sont mis en contact avec 10 mL de tampon acridine (22 µM acridine orange, 5 mM EDTA, 0,15 M NaCl, 0,1 M tampon citrate phosphate à pH 6) pendant 15 minutes, aucun lavage n'est nécessaire.

Observations

La plateforme de CLSM se compose de trois éléments :

↳ Microscope inversé TE2000 U Eclipse (Nikon), objectif utilisé 20X (N.A.= 0,5)

↳ Tête confocale Radiance 2100 modèle AGR-3Q BLD (Biorad), 3 lasers ont été utilisés : Argon à 488 et 514 nm (Syto[®] 9 et acridine orange), diode rouge à 637 nm (iodure de propidium et réflexion du CA) et une diode bleue à 405 nm (Autofluorescence du phénanthrène).

↳ Acquisition et traitement informatique grâce au logiciel Lasersharpe 2000 (Biorad)

Une fois marqués, les grains de charbon actif sont placés dans des cupules de microplaques LUMOX[®] multiwell 96 TC quality (vivascience) dans 200 µL de NaCl, 0,1 M pour l'observation. L'utilisation de ce type de microplaque ne perturbe pas le trajet optique.

2.3.5 Analyses statistiques

L'analyse statistique des données des différentes expériences a été réalisée soit grâce au test t de student soit grâce à des ANOVA (p<0,05%) en utilisant le logiciel STATVIEW (SAS institute). Dans les figures et les tableaux sont présentés les moyennes et les erreurs standards.

Résultats et discussion

3 Résultats discussion

3.1 Identification des souches et caractérisation des matériaux présélectionnés

3.1.1 Identification des souches bactériennes

Au cours de cette étude, cinq souches bactériennes ont été utilisées. Elles ont été isolées à partir de sols contaminés par des HAP et sélectionnées suivant deux critères : capacité à dégrader les HAP et production de biofilm. L'identification des souches grâce au séquençage d'un fragment de l'ADN ribosomique 16S montre que les cinq souches bactériennes sont gram négatives. L'utilisation de la base de données GenBank a permis de trouver les séquences les plus proches des cinq souches utilisées (Tableau 6).

Souche	NAH1	MATE3	MATE7	MATE10	MATE12
identification	<i>Burkholderia sp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	<i>Stenophomonas maltophilia</i>	<i>Stenophomonas maltophilia</i>
N° identification (GenBank)	AY178099	AE016778	AY189752	AY445079	AT367030
homologie de séquence	100%	99%	100%	99%	99%
Biofilm	+	+	+	-	-

Tableau 6. Caractérisation des souches bactériennes utilisées dans cette étude.

L'identification des cinq souches correspond à des espèces bactériennes qui ont fait l'objet d'études concernant la problématique des sols contaminés par des polluants organiques (Tableau 7). La souche NAH1 a constitué la souche de référence pour l'ensemble de l'étude en raison de son utilisation au cours de travaux antérieurs réalisés au laboratoire (Amellal *et al.*, 2001). *Pseudomonas putida* a fait l'objet de nombreux travaux concernant la dégradation du naphthalène (Kozlova *et al.* 2004, Mc Nally *et al.* 1999) dans les sols, ainsi que sur l'impact de surfactant (Doong et lei 2003) et d'autres sources de carbone (pyruvate) sur la dégradation du naphthalène (Lee *et al.*, 2003). Des bactéries du genre *Achromobacter* (MATE7) ont été isolées dans des sols historiquement contaminés par des PCB (Rojas-Avelizapa *et al.* 1999) ou par des HAP (Adreoni *et al.* 2004). Cutright *et al.* (1994) ont également étudié leur capacité à traiter des sols contaminés par des HAP.

NAHI	MATE3	MATE7	MATE10	MATE12
<i>Burkholderia sp</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>Stenophomonas maltophilia</i>	<i>Stenophomonas maltophilia</i>
Juhasz <i>et al.</i> 1997 Amellal <i>et al.</i> 2001	Doong et Lei 2003 Lee <i>et al.</i> 2003 Kozlova <i>et al.</i> 2004 Mc Nally <i>et al.</i> 1999	Cutright et Lee 1994 Rojas-Avelizapa <i>et al.</i> 1999 Andreoni <i>et al.</i> 2004	Boochan <i>et al.</i> 1998 Juhasz <i>et al.</i> 2000	

Tableau 7. Articles publiés sur la problématique de dégradation de polluants organiques utilisant des souches bactériennes proches de celles utilisées dans cette étude.

3.1.2 Caractérisation des matériaux

3.1.2.1 Surface spécifique

Le CA présente une surface spécifique (Tableau 8) beaucoup plus importante que celles des deux autres matériaux. Les valeurs de surface spécifique obtenues pour ce matériau sont beaucoup plus importantes que celles qui ont été observées par Jayr (2001) et Mahjoub (1999) sur des craies ($3,49 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) ou des argiles limoneuses ($131 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$). La méthode du t-plot permet de déterminer la surface microporeuse correspondant aux pores de rayons inférieurs à 8 nm. Les mesures réalisées sur le charbon actif montrent que la surface hors-microporosité ne représente que 12 à 22 % de la surface spécifique totale. La surface hors-microporosité peut être assimilée à la surface externe totale. Ceci semble indiquer que la surface réactive du charbon est principalement interne.

	Surface spécifique (BET)	Surface hors microporosité	Porosité totale	Vme (1,8-50nm)	Vma (>50nm)	Vb (>1µm)	Surface accessible modèle 1	Surface accessible modèle 2
	$\text{m}^2.\text{g}^{-1}$	$\text{m}^2.\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$	$\text{cm}^3.\text{g}^{-1}$	$\text{m}^2.\text{g}^{-1}$	$\text{m}^2.\text{g}^{-2}$
CA	1347,17	175	0,359	0,129	0,230	0,095	1,360	0,442
CAPHE1	1044,59	237	0,214	0,071	0,143	0,046	0,930	0,278
CAPHE2	1108,41	250	0,241	0,108	0,133	0,036	1,120	0,352
Pz	1,66	1,44	0,154	0,005	0,149	0,113	3,063	0,941
PzF	2,29	2,08	0,138	0,009	0,129	0,092	2,582	0,771

Tableau 8. Surface spécifique BET et volumes de pores obtenus par porosimétrie au mercure pour le charbon actif non recouvert (CA) ou recouvert de PHE (CAPHE1, CAPHE2), la pouzzolane (Pz) et la pouzzolane recouverte de fioul (PzF). Mesoporosité (Vme), macroporosité (Vma), Porosité supérieure à 1 µm (Vb), Surface accessible aux bactéries modèle 1 et 2.

3.1.2.2 Distribution des tailles et volumes de pores

La porosimétrie au mercure permet de caractériser la distribution des pores compris entre 1,8 nm et 100 µm. Les valeurs obtenues montrent que CA présente une porosité deux

fois plus importante que Pz et PzF (Tableau 8). La présence de fioul F2 à la surface de Pz diminue la porosité totale d'environ 10 %. Au niveau de la distribution de la porosité, la présence de fioul lourd affecte surtout la macroporosité qui est réduite de près de 20 % (Tableau 8). F2 semble donc s'adsorber principalement au niveau des macropores, sans pour autant bloquer les pores de plus petits diamètres. La distribution de la porosité (Figure 11) en fonction du rayon des pores montre que la présence de F2 affecte les pores de rayon supérieur à 10 μm . Pour les rayons de pores plus petits, l'écart Pz-PzF se stabilise et a même tendance à se réduire pour les pores inférieurs à 1 μm de rayon. Les résultats de porosimétrie mercure confirment l'importance de la microporosité pour le charbon actif. En effet, les pores dont le rayon est inférieur à 50 nm représentent 36 % de la porosité totale alors qu'ils représentent moins de 3 % pour Pz et 6 % pour PzF. La Figure 11 montre que la porosité du CA est la plus faible pour les pores dont le rayon est supérieur à 5 μm .

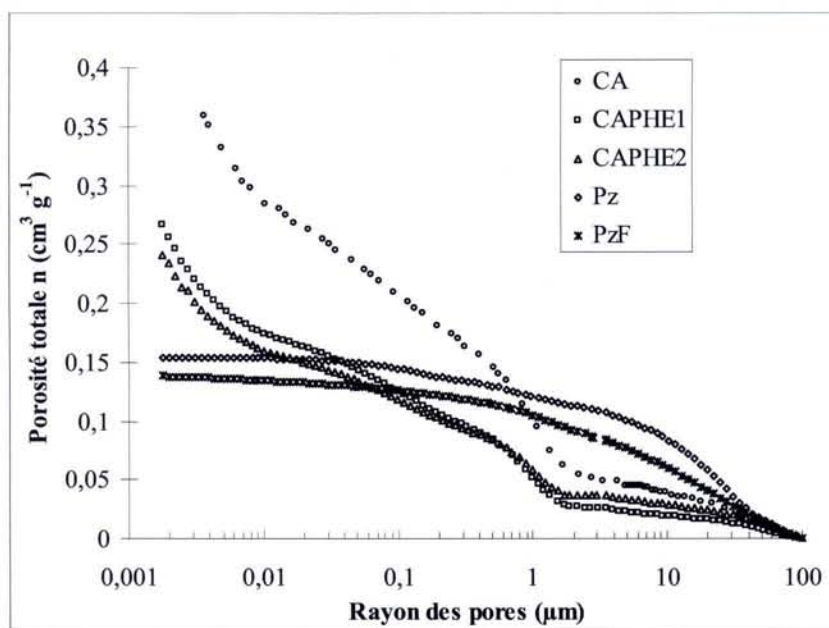


Figure 11. Distribution de la porosité (n) en fonction des rayons de pores pour le charbon actif (CA), la pouzzolane (Pz) et la pouzzolane recouverte de fioul (PzF) estimée par porosimétrie au mercure.

La distribution des volumes de pores de CA recouvert par du PHE (CAPHE1 et CAPHE2) montre une réduction de la porosité totale (respectivement – 40 et – 33 %) (Tableau 8). La classe de pores la plus affectée correspond aux pores de rayons supérieurs à 1 μm . Par rapport au résultat obtenu avec CA, le volume de pore correspondant est réduit de 51 % dans le cas de CAPHE1 et de 62 % pour CAPHE2. Cette classe de pores peut être considérée comme la porosité accessible aux bactéries dont la taille est de l'ordre du micron. Ceci suggère que les microorganismes ne peuvent accéder qu'à une fraction limitée de la

porosité totale (CA 26 %, CAPHE1 21 %, CAPHE2 15 %). Cette réduction de la porosité et des valeurs de surface spécifique peut être due au fait que l'adsorption du PHE pourrait bloquer l'accessibilité à certains pores. La présence d'une plus grande quantité de PHE adsorbé (CAPHE2), ne réduit pas la porosité totale. Cependant, la réduction de la porosité accessible aux bactéries semblent indiquer que l'adsorption du PHE affecte cette classe de pores en particulier.

L'estimation des surfaces accessibles aux bactéries à partir des résultats de porosimétrie mercure montre, dans le cas du charbon actif, que celle-ci est très faible par rapport à la surface spécifique totale obtenue par la méthode BET : CA 0,1 %, CAPHE1 0,07 %, CAPHE2 0,08 % (avec la méthode 1 de calcul, voir chapitre 2.3.1.2). L'interface microorganismes - CA~PHE adsorbé est donc limitée ce qui ne favorise pas les phénomènes de transfert de PHE vers les bactéries. La présence de PHE à la surface du CA réduit la surface accessible d'environ 20 à 30 %. Cette variation est plus faible que celle observée au niveau des Vb, ceci pourrait être du au traitement mathématique des données. Le pourcentage de la surface, accessible aux bactéries, pour Pz et PzF est environ 2 à 3 fois plus important par rapport à CA recouvert ou non de PHE. Ceci confirme les différences entre CA et Pz observées au niveau de la distribution de la porosité.

3.1.3 Conclusion du chapitre

Les propriétés physiologiques des bactéries dégradantes interviennent dans les phénomènes d'interactions entre bactéries et PHE (substrat), d'une part, et entre bactéries et matériaux (support), d'autre part. La capacité des souches NAH1, MATE3 et MATE7 à produire des biopolymères pourrait affecter leur efficacité à dégrader le PHE en particulier dans un système bactéries-PHE-matériaux. L'identification des cinq souches bactériennes grâce à des outils de biologie moléculaire a montré qu'elles étaient proches d'espèces ayant été également isolées à partir de sols contaminés par des polluants organiques.

Les trois matériaux présélectionnés présentent des surfaces spécifiques et des porosités totales très différentes. Le charbon actif (CA) est un matériau très microporeux. Il développe une surface spécifique totale, entre 500 et 1000 fois plus importante que la pouzzolane recouverte (PzF) ou non (Pz) de fioul lourd. La comparaison des distributions de rayons de pores montre que les pouzzolanes présentent une macroporosité plus importante que le charbon actif. Ces différences pourraient affecter leur capacité à adsorber le PHE. De plus, la présence d'une macroporosité importante pour la pouzzolane, recouverte ou non de fioul, pourrait également favoriser l'adsorption des bactéries.

L'étude des mécanismes de sorption de PHE sur les trois matériaux constitue la première étape dans le processus de sélection d'un matériau modèle. Le chapitre suivant s'est attaché à suivre les cinétiques et les isothermes d'adsorption de PHE sur CA, Pz et PzF. De plus, des essais de biodégradation de PHE par une bactérie dégradante (NAH1) en présence ou en absence de matériaux ont été réalisés afin d'étudier l'impact de l'adsorption du PHE sur sa biodégradation.

3.2 Etudes des phénomènes de sorption et de biodégradation du phénanthrène sur les matériaux présélectionnés

Cette deuxième partie avait pour objectif de sélectionner un matériau modèle susceptible d'être utilisé dans une BPR pour traiter une pollution par les HAP. Lors de la réalisation d'une BPR, le choix du matériau réactif doit répondre à plusieurs critères décrits dans le paragraphe 1.3.2 :

- ↳ Perméabilité importante pour ne pas constituer une barrière pour le passage du flux d'eau souterraine.
- ↳ Capacité de rétention du polluant.
- ↳ Dans le cas particulier des HAP, la biodégradation du polluant dans la BPR doit aussi être prise en compte.

Trois matériaux ont été choisis pour cette étude, le charbon actif, et la pouzzolane recouverte ou non de fioul (2.1.1). Les phénomènes de sorption du phénanthrène, utilisé comme HAP modèle, sur les trois matériaux présélectionnés ont été caractérisés en déterminant les cinétiques d'adsorption, en effectuant des isothermes d'adsorption et de désorption. Ces essais ont été réalisés dans des réacteurs fermés. Par ailleurs, la biodégradation du phénanthrène par une bactérie dégradante en présence ou en absence de ces trois matériaux a été comparée.

3.2.1 Cinétique d'adsorption du phénanthrène

Les cinétiques réalisées sur les trois matériaux (Figure 12) montrent que le temps de saturation est rapide. Après 24 heures de contact, l'équilibre solide / solution est atteint pour Pz et PzF. Dans le cas de CA, l'équilibre semble atteint après 48 heures d'agitation. Les quantités de phénanthrène adsorbées sont très différentes pour les trois matériaux. En particulier, la capacité de fixation du CA est 100 à 1000 fois plus importantes que celles de PzF et Pz, respectivement. La différence observée au niveau du temps d'équilibre entre les trois matériaux pourrait être due à la forte microporosité de CA. En effet, la diffusion du PHE au sein de la porosité du CA pourrait être limitée par rapport à Pz ou PzF. Le recouvrement de la pouzzolane par le fioul F2 multiplie par 10 sa capacité de fixation de PHE.

Les temps d'équilibre observés pour les trois matériaux sont relativement plus rapides que ceux obtenus lors d'essais d'adsorption du PHE sur des échantillons de terre et de sédiment. Huang et Weber (1997) ont observé des temps d'équilibre apparent de 21 jours pour la phase d'adsorption et de 14 jours pour la phase de désorption. La complexité des échantillons utilisés en terme de composition en matière organique, de granulométrie, peut expliquer cette différence dans les temps d'équilibre.

Ces mesures de cinétique ont permis de fixer à 48 heures le temps d'agitation qui a été utilisé pour la réalisation des isothermes d'adsorption.

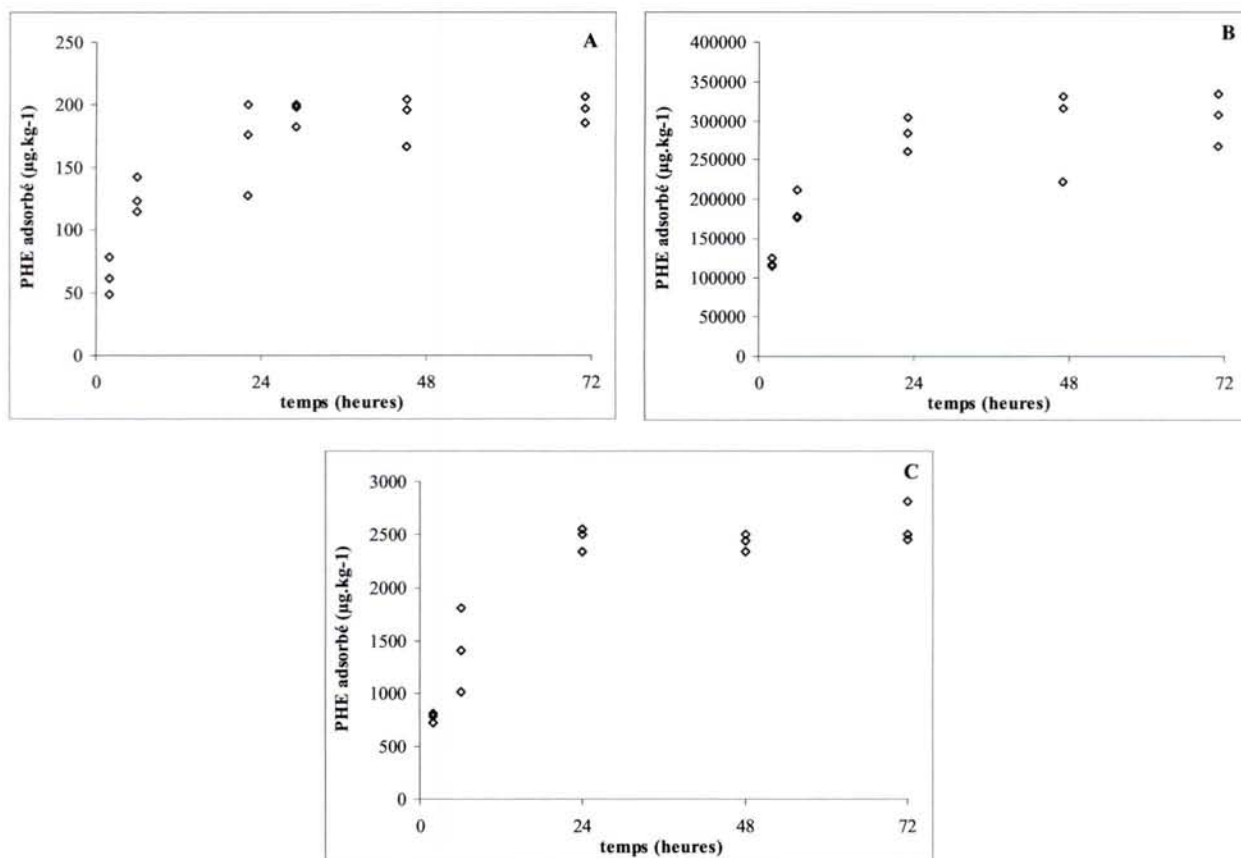


Figure 12. Cinétique d'adsorption du phénanthrène sur la pouzzolane (A), le charbon actif (B) et la pouzzolane recouverte de fioul (C).

3.2.2 Isotherme d'adsorption et de désorption du phénanthrène

L'étude de l'affinité du PHE pour les trois matériaux a été complétée par des isothermes d'adsorption et de désorption. Les isothermes d'adsorption ont été réalisées dans une gamme

de concentration allant jusqu'à $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ soit 30% de la solubilité dans l'eau afin d'éviter la présence de cristaux de phénanthrène qui pourraient modifier les mécanismes d'adsorption sur les matériaux testés. Le caractère hydrophobe du PHE entraîne sa fixation sur de nombreuses surfaces utilisées au cours de l'expérience (verrerie, septum...). Ces pertes par fixation peuvent entraîner des erreurs lors de la modélisation des phénomènes de sorption (Gaboriau et Saada 2001, Huang et Weber 1997). Afin de limiter ce type d'erreur, la solution de phénanthrène est laissée en contact pendant 24 heures avec le réacteur avant de déterminer la concentration initiale.

Les résultats des isothermes d'adsorption (Figure 13) ont été modélisés par un modèle de Freundlich. Les paramètres K_f et n obtenus pour chaque matériau testé sont résumés dans le Tableau 10. L'utilisation de ce modèle permet une comparaison rapide des matériaux (Scherer *et al.* 2000). Les résultats obtenus montrent que le CA possède la plus grande capacité de fixation du phénanthrène. Sa capacité de fixation est 1000 fois supérieure à celle de la pouzzolane et 100 fois supérieure à celle de la pouzzolane recouverte de fioul (Tableau 9). Ce résultat est cohérent au vu de l'utilisation fréquente du CA dans de nombreux procédés (traitement de l'eau, des gaz) pour sa capacité à piéger un grand nombre de composés (EPA 1998, Rael *et al.* 1993). Cette capacité de fixation est 2 fois plus importante que celle observée par Gaboriau et Saada (2001) avec une argile, la kaolinite, recouverte par F2. La grande surface réactive du charbon actif semble donc jouer un rôle important dans sa capacité de rétention du phénanthrène.

La capacité d'adsorption du phénanthrène par Pz est très limitée, environ $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$, par rapport au CA mais également par rapport à d'autres supports tels que des carbonates de calcium ($5000 \mu\text{g.kg}^{-1}$), des blocs de craie (4000 à $5000 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (Jayr 2001) ou de la Kaolinite ($250 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (Gaboriau et Saada 2001). Cette faible capacité de fixation de Pz peut être due à sa très faible teneur en carbone ainsi qu'à sa surface réactive limitée. Le recouvrement de la pouzzolane par F2 augmente sa capacité de fixation d'un facteur proche de 200. La présence de composés organiques complexes sur la surface pourraient favoriser les interactions hydrophobes entre PzF et le phénanthrène. Cette capacité de sorption pourrait être due au degré d'aromaticité important de F2 (Gaboriau et Saada 2001). Le fioul F2 fixé sur la pouzzolane représente cependant une faible quantité de matière organique ($0,25 \text{ g.kg}^{-1}$ carbone organique total). Gaboriau et Saada (2001) avaient observé que le recouvrement de la kaolinite par F2 accentuait sa capacité de fixation d'un facteur 4000. La différence observée

pourrait venir de la surface développée beaucoup plus importante de la kaolinite par rapport à la pouzzolane. La surface de contact présentant des zones hydrophobes serait donc plus importante ce qui augmenterait la capacité de rétention du phénanthrène. La présence de F2 ne semble pas modifier le paramètre n de l'isotherme de Freundlich, comme cela avait été observé par Gaboriau et Saada (2001) lors du recouvrement de la kaolinite par F2.

Les mécanismes de sorption du phénanthrène sur CA et PzF ne semblent pas être identiques. Dans le cas de CA, sa capacité de rétention est liée à sa grande surface spécifique et à la présence d'une microporosité importante. Pour PzF, la présence de F2 ne semble pas modifier la porosité mais permet la mise en place de liaisons hydrophobes avec le PHE qui accentuent la capacité de rétention de Pz.

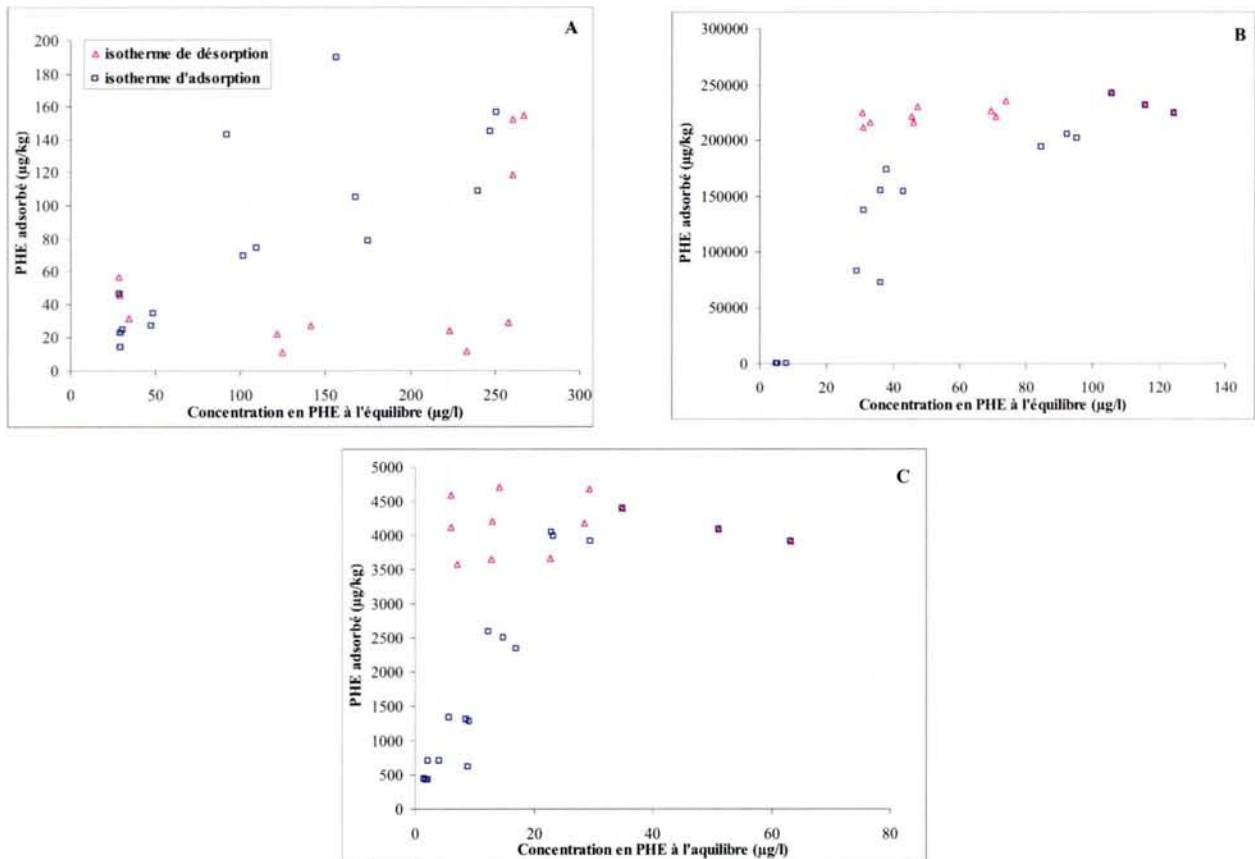


Figure 13. Isotherme d'adsorption et de désorption du PHE sur la pouzzolane (A), le charbon actif (B) et la pouzzolane recouverte de F2 (C). Isotherme d'adsorption en bleue, isotherme de désorption en rouge.

La capacité de traitement d'une BPR tient compte de sa capacité d'adsorption du ou des contaminants mais également de sa capacité de rétention. L'étude des isothermes de désorption permet d'évaluer les risques de relargage des HAP lorsque la concentration en solution diminue.

	Kf	n
CA	12578 +/- 468	0,61 +/- 0,15
Pz	1,1 +/- 0,1	0,88 +/- 0,02
PzF	176 +/- 27	0,97 +/- 0,05

Tableau 9. Coefficient d'adsorption et mesure du Kd lors de l'étape d'adsorption du phénanthrène sur le charbon actif (CA), la pouzzolane (Pz) et la pouzzolane recouverte de fioul F2 (PzF).

Les résultats obtenus montrent deux comportements (Figure 13). Dans le cas du CA ou de PzF, la désorption est très faible, comprise entre 1 et 2 % à chaque étape. Pour Pz, le renouvellement pour moitié de la solution entraîne une désorption importante du PHE (80 à 90%). Par la suite, la désorption est plus faible, comprise entre 2 et 7 %. La présence de F2 à la surface de la pouzzolane semble donc limiter les phénomènes de désorption. En effet, F2 est composé d'un mélange de molécules organiques, dont les asphaltènes, qui semblent jouer un rôle prépondérant dans l'adsorption du phénanthrène (Gaboriau et Saada 2001). L'énergie de liaison mise en jeu entre F2 et PHE doit être suffisante pour limiter les mécanismes de désorption. Dans le cas du CA, la prédominance de la microporosité pourrait constituer une limite pour les phénomènes de désorption en diminuant la diffusion moléculaire du PHE adsorbé dans les micropores. Cette hypothèse est cohérente avec les expériences de cinétique d'adsorption, au cours desquelles le temps d'équilibre pour CA était deux fois plus long que pour Pz et PzF.

Au cours de la troisième étape de désorption pour Pz la quantité finale de PHE adsorbé a été la plus importante. Ceci a également été observé, mais à un niveau plus faible, dans le cas de PzF lors de la première étape de désorption. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces observations. Comme cela été dit précédemment, une fraction du PHE (5-10%) s'adsorbe sur les parois du réacteur. La diminution de la concentration en solution pourrait entraîner un relargage d'une partie du PHE initialement présent à la surface du réacteur qui s'adsorberait alors sur Pz ou PzF. Dans le cas de PzF, un autre mécanisme pourrait expliquer cette augmentation de la quantité de PHE adsorbé. En effet, cette augmentation s'est produite lors

de la première étape de désorption. Or, de nombreux travaux (Hatzinger et Alexander 1995, Mahjoub 1999, Pignatello et Xing 1996) sur l'adsorption de composés organiques ont montré que celle-ci pouvait se décomposer en deux phases : une phase d'adsorption rapide suivie d'une phase plus lente qui peut être interprétée comme un état de pseudo-équilibre (Hatzinger et Alexander 1995, Pignatello et Xing, 1996). Les résultats obtenus avec PzF pourraient être la somme de mécanismes de désorption et d'adsorption dont la cinétique n'aurait atteint qu'un état de pseudo équilibre.

Au niveau de la capacité d'adsorption du phénanthrène, le charbon actif montre la capacité la plus élevée et semble le plus apte à être utilisé au sein d'une BPR. Cependant, les essais en batch peuvent conduire à une sous estimation de la capacité de fixation de l'adsorbant (Rael *et al.* 1993). Les essais en colonne (chapitre 3.5) permettront d'étudier la capacité de rétention du matériau dans un système dynamique. De plus, les essais en colonne permettront de s'assurer de la perméabilité des matériaux. Les mécanismes de biodégradation de composés organiques dans un sol peuvent modifier ou être modifiés par des phénomènes de rétention de ces composés sur la matrice solide. Dans le chapitre suivant, des essais de biodégradation en batch ont été réalisés afin d'étudier l'effet de la présence de matériau sur la biodégradation du phénanthrène. De plus, différentes souches bactériennes ont été testées pour tester l'effet de la production de biopolymères et de la mobilité sur la minéralisation du phénanthrène.

3.2.3 Effet du support sur la biodégradation du phénanthrène

Suite aux essais de sorption du phénanthrène sur CA, Pz et PzF, des essais de biodégradation du PHE par une souche dégradante en présence ou en absence de ces matériaux ont été réalisés. Le choix de la souche bactérienne utilisée (NAH1) s'est fait en fonction de travaux antérieurs (Amellal *et al.* 2001) réalisés au laboratoire sur la dégradation des HAP dans des échantillons de terre. Cette première expérience a été réalisée en utilisant du PHE marqué au ^{14}C , ce qui a permis d'obtenir une bonne sensibilité pour le suivi de la minéralisation.

Pour l'ensemble des essais de minéralisation, les témoins abiotiques avec et sans matériaux ont montré un taux de dégradation abiotique faible (< 2,5%). Les données issues

de ces témoins n'ont pas été présentées dans la suite de ce document et ont été soustraites des résultats présentés.

En absence de matériaux, seulement 84% de PHE ajouté a été retrouvé, ce qui peut être lié à l'adsorption sur les parois des flacons. Lors de la préparation des réacteurs, la mesure de l'activité en solution à t_0 montre que la quantité de PHE initiale en solution en présence de matériaux est comprise entre 1,5 et 20 % des quantités ajoutées (Tableau 10). Le PHE apporté est donc majoritairement adsorbé à la surface des matériaux en particulier pour les traitements avec charbon actif.

	CA	Pz	PzF	PHE
% PHE adsorbé	82,4 +/-0,6	67,6 +/- 4,9	68,4 +/-3,8	0
% PHE en solution	1,5 +/- 0,05	20,4 +/- 5	17,9 +/- 3,6	83,9 +/- 5,1

Tableau 11. Répartition du PHE dans les batch à t_0 en présence de charbon actif (CA), de pouzzolane (Pz), de pouzzolane recouverte par un fioul lourd (F2) (PzF), et en absence de matériaux (PHE). Moyenne et erreur standard (n=3).

Les analyses de CO_2 ont été réalisées sur une période de 22 jours. Les mesures ont été arrêtées après cette durée car le taux de minéralisation n'était plus significativement différent des témoins à partir du 18^{ème} jour. Dans le traitement ne contenant pas de matériaux (noté PHE dans la Figure 14), la quantité de phénanthrène minéralisé a atteint 9,1 % du phénanthrène initialement présent (Figure 14). En présence de PzF, la quantité minéralisée semble plus faible (3,4 %), mais la différence n'est pas significative. La présence de CA ou de Pz stimule la dégradation du PHE par NAH1 qui a atteint respectivement 25,3 et 20,7 %.

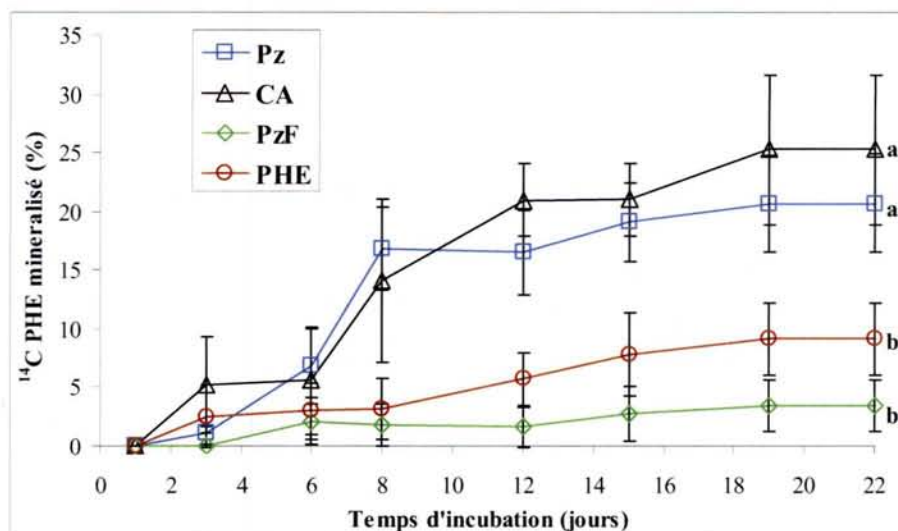


Figure 14. Minéralisation du PHE en réacteurs fermés, en absence de matériau (PHE), en présence de pouzzolane recouverte (PzF) ou non (Pz) par un fioul lourd F2, et en présence de charbon actif (CA). Moyenne et erreur standard (n=3).

L'effet positif de CA et Pz sur la minéralisation n'est significatif qu'à partir de 8 jours d'incubation. Ceci peut correspondre au temps de colonisation du matériau par l'inoculum bactérien. En effet, le nombre de bactéries en suspension a diminué fortement pendant les 3 premiers jours d'incubation (Figure 15). Cette première phase d'adsorption des bactéries sur le solide est plus importante pour Pz et PzF par rapport au CA. Ceci pourrait être dû aux différences observées au niveau de la distribution de la porosité (Tableau 8), Pz et PzF présentant une macroporosité plus importante que CA. L'utilisation de la méthode de calcul de la surface accessible aux bactéries (voir chapitre 2.3.1.2) montre que celle-ci est plus importante pour Pz ($3,1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) et PzF ($2,6 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) que pour CA ($1,4 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$). La présence de F2 à la surface de la pouzzolane ne semble pas affecter l'adsorption de NAH1 au cours de la première phase d'adsorption même si la surface accessible est plus faible. Le nombre de bactéries en suspension n'est pas corrélé avec les résultats de minéralisation. En effet, l'augmentation du nombre de bactéries en suspension est plus importante pour CA et PzF que pour Pz.

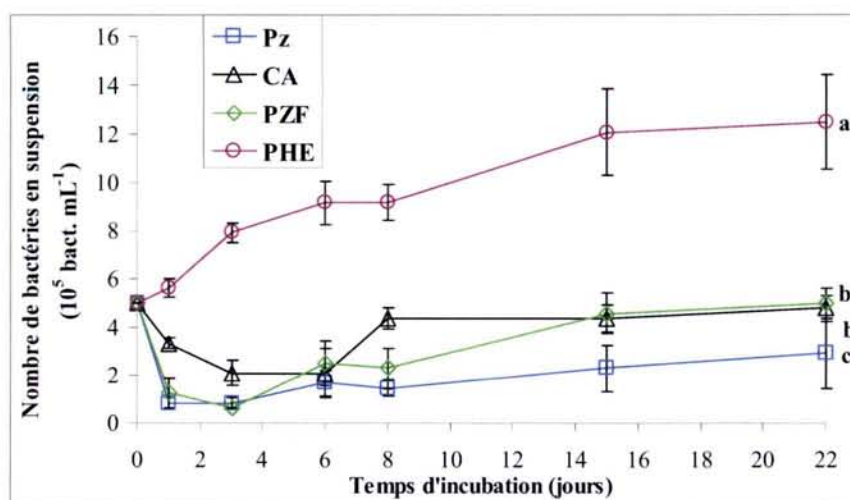


Figure 15. Nombre de bactéries en suspension lors des essais de biodégradation de PHE, en absence de matériau (PHE), en présence de pouzzolane recouverte (PzF) ou non (Pz) par un fioul lourd F2, et en présence de charbon actif (CA). Moyenne et erreur standard (n=3).

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer l'augmentation de la minéralisation de PHE en présence de CA et Pz. Tout d'abord, la souche NAH1 a été sélectionnée pour sa capacité à dégrader les HAP comme seule source de carbone mais également pour sa capacité à produire des biopolymères. Ceci pourrait lui permettre d'accéder à une quantité plus importante de PHE adsorbé et/ou d'augmenter la cinétique de désorption de PHE. En effet, la présence de ce type de molécules peut localement augmenter la solubilité du PHE et ainsi favoriser sa minéralisation. De tels mécanismes ont déjà été observés par Scheibenbogen *et al.* (1994) et Van Dyke *et al.* (1993a, b) impliquant l'effet de biosurfactants sur la solubilisation des HAP. Eriksson *et al.* (2002) ont également montré que des bactéries du genre *Polaromonas*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Caulobacter*, *Variovorax* ou *Pseudomonas* sp. isolées à partir d'un biofilm étaient capable de dégrader à un taux important le phénanthrène ou le pyrène adsorbé. Une autre hypothèse pourrait être un effet support des matériaux. En effet, l'activité métabolique des bactéries adsorbées est plus importante que lorsqu'elles sont en suspension (Moreno-Castilla *et al.* 2003). De plus la présence d'un support peut favoriser leur croissance. Toutefois, comme seule la croissance des bactéries en solution a été estimée et non pas la croissance des bactéries fixées, il n'est pas possible de conclure quant à cette hypothèse.

Les résultats des isothermes de désorption ont montré que celle-ci était limitée pour PzF et CA. Cependant la présence de CA a favorisé la dégradation du phénanthrène alors que celle de PzF n'a pas montré d'effet significatif. Ces résultats confirment le fait que les mécanismes de sorption de PHE sur CA et PzF ne sont pas identiques. Dans le cas de PzF,

les interactions PHE / fioul lourd de type hydrophobe pourraient conduire à une séquestration du PHE qui ne serait plus biodisponible. Certains travaux (Nam et Kim 2002, Richnow *et al.* 1998, 1999) ont mis en évidence ce type d'interaction matière organique / HAP qui conduit à la formation de résidus liés dont l'extractabilité et la biodisponibilité sont fortement réduites. Cependant, le pourcentage initial de PHE en solution (18 %) est supérieur au taux final de minéralisation (3,4 %) ce qui suggère que la disponibilité du phénanthrène n'est pas limitante. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ces résultats. Tout d'abord, la présence de fioul lourd dans le système pourrait constituer une autre source de carbone pour NAH1, même si les quantités de fioul adsorbé sont limitées ($0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$). De plus, après 3 et 6 jours d'incubation, la minéralisation de PHE dans les traitements avec PzF est presque nulle ($< 0,1 \%$ du PHE initial). Durant cette période, l'adsorption du PHE sur le matériau a pu se poursuivre via des phénomènes de sorption de cinétique lente réduisant le pourcentage de PHE en solution par rapport aux mesures effectuées à t_0 . Cependant, ce mécanisme ne doit correspondre qu'à une adsorption limitée. Dans le cas de CA, les interactions PHE / matériau pourraient impliquer des liaisons de type Van der Waals. La production de biopolymères par NAH1 pourrait alors favoriser la désorption du PHE et augmenter sa biodisponibilité.

Cette expérience montre que la présence d'une phase solide modifie les capacités de minéralisation d'une bactérie dégradante. La présence des matériaux CA ou Pz favorise la minéralisation du PHE qui est dégradé à un taux plus important que lorsqu'il est uniquement en solution. Au contraire, PzF ne montre pas d'effet significatif sur la minéralisation. Les interactions PHE / matériau et bactéries / matériau semblent donc jouer un rôle prépondérant dans les mécanismes de biodégradation des HAP adsorbés sur une surface solide.

3.2.4 Conclusion du chapitre

La comparaison des trois matériaux présélectionnés vis-à-vis de leur capacité d'adsorption montre que la quantité de PHE adsorbé sur CA est 1000 fois plus importante qu'avec Pz. Le recouvrement de Pz par du fioul lourd augmente sa capacité d'adsorption d'un facteur 200. Les essais de minéralisation de PHE par une souche bactérienne dégradante (NAH1) en présence ou en absence de matériaux montrent qu'en présence de Pz et CA, la quantité de phénanthrène minéralisée est plus importante que lors des essais en absence de matériau. Pour cette souche, l'adsorption de PHE sur CA ne constitue pas un facteur limitant pour sa capacité à dégrader le phénanthrène.

Les résultats des essais de sorption de PHE sur les trois matériaux, ainsi que ceux obtenus lors de l'expérience de biodégradation montrent que le CA répond en partie aux critères de choix d'un matériau pour son utilisation dans une Barrière Perméable Réactive.

En effet, CA présente des capacités de rétention de PHE importante (forte adsorption et désorption limitée). De plus, la présence de CA dans un système CA / PHE / bactéries favorise la minéralisation du PHE. C'est pourquoi le CA a été choisi pour la suite des essais de biodégradation ainsi que pour étudier l'adsorption des bactéries sur la phase solide.

Au cours de cette expérience, les résultats ont été obtenus en utilisant une seule souche bactérienne dégradante. Or, certains paramètres phénotypiques en particulier la production de biopolymères semblent jouer un rôle prépondérant vis-à-vis de la biodégradation. C'est pourquoi la suite de l'étude s'est attachée à comparer 5 souches bactériennes dégradantes NAH1, MATE3, MATE7, MATE10, MATE12 vis-à-vis de leur capacité d'adsorption sur CA.

3.3 Adsorption des bactéries sur le charbon actif : effet du phénanthrène et caractérisation des propriétés de surface

Au sein d'une Barrière Perméable Réactive (BPR), la mise en place d'une communauté bactérienne, de manière artificielle ou naturelle, et notamment leur adsorption sur la BPR peut affecter son efficacité. Dans ce troisième chapitre, l'adsorption de 5 souches bactériennes sur des quantités croissantes de CA a été étudiée. Au cours de cette expérience, l'effet de l'adsorption du phénanthrène à la surface du CA sur la capacité de sorption des bactéries a été pris en compte. Les mécanismes de sorption des microorganismes à la surface d'une surface solide incluent des interactions électrostatiques et hydrophobes (Rijnaars *et al.* 1996) et dépendent des propriétés de surface des bactéries et du solide en question, ici le CA. C'est pourquoi la deuxième partie de ce chapitre s'est attachée à la caractérisation des propriétés de surface des bactéries.

3.3.1 Adsorption de différentes souches bactériennes sur le charbon actif et effet du phénanthrène

Des isothermes d'adsorption des 5 souches bactériennes dégradant les HAP sur du CA ont été réalisées. Comme cela a été expliqué au chapitre 2.1.2, parmi celles-ci, 3 souches produisent des biofilms NAH1, MATE3 et MATE7, tandis que MATE10 et MATE12 n'en produisent pas.

Les essais d'adsorption ont été réalisés sur une période d'une heure. Les résultats obtenus sur un gradient de charbon actif montrent que le pourcentage de bactéries adsorbées est équivalent pour les 5 souches testées (Figure 16). Le taux maximum de bactéries adsorbées sur le CA est compris entre 64,7 % (MATE12) et 68,5 % (MATE3) des bactéries initiales. La présence de PHE à la surface du charbon actif, modifie les capacités d'adsorption des souches testées sauf pour MATE12.

Deux rapports solide/liquide ont été utilisés pour le recouvrement du CA par PHE (voir chapitre 2.2.2.2). Dans le cas de CAPHE1, le rapport employé correspond à celui utilisé au cours des essais de biodégradation décrit dans le chapitre 3.3.1. Pour CAPHE2, une quantité inférieure de CA a été utilisée pour augmenter le taux de recouvrement par PHE.

Pour les souches NAH1 et MATE3, la présence de phénanthrène favorise l'adsorption des bactéries sur CA. Dans le cas des traitements avec 100 mg de CAPHE1, le pourcentage de bactéries adsorbées est augmenté d'environ 15 % pour NAH1 et de près de 9 % pour MATE3 (Figure 16). Pour MATE7, avec CAPHE1, l'adsorption des bactéries semble plus importante qu'avec CA pour les petites quantités de CA, et plus faible avec des quantités de matériaux plus importantes. Mais l'analyse ANOVA sur l'ensemble des données ne montre pas de différences significatives. Pour les deux autres souches, l'adsorption bactérienne sur CAPHE1 est la même qu'avec CA.

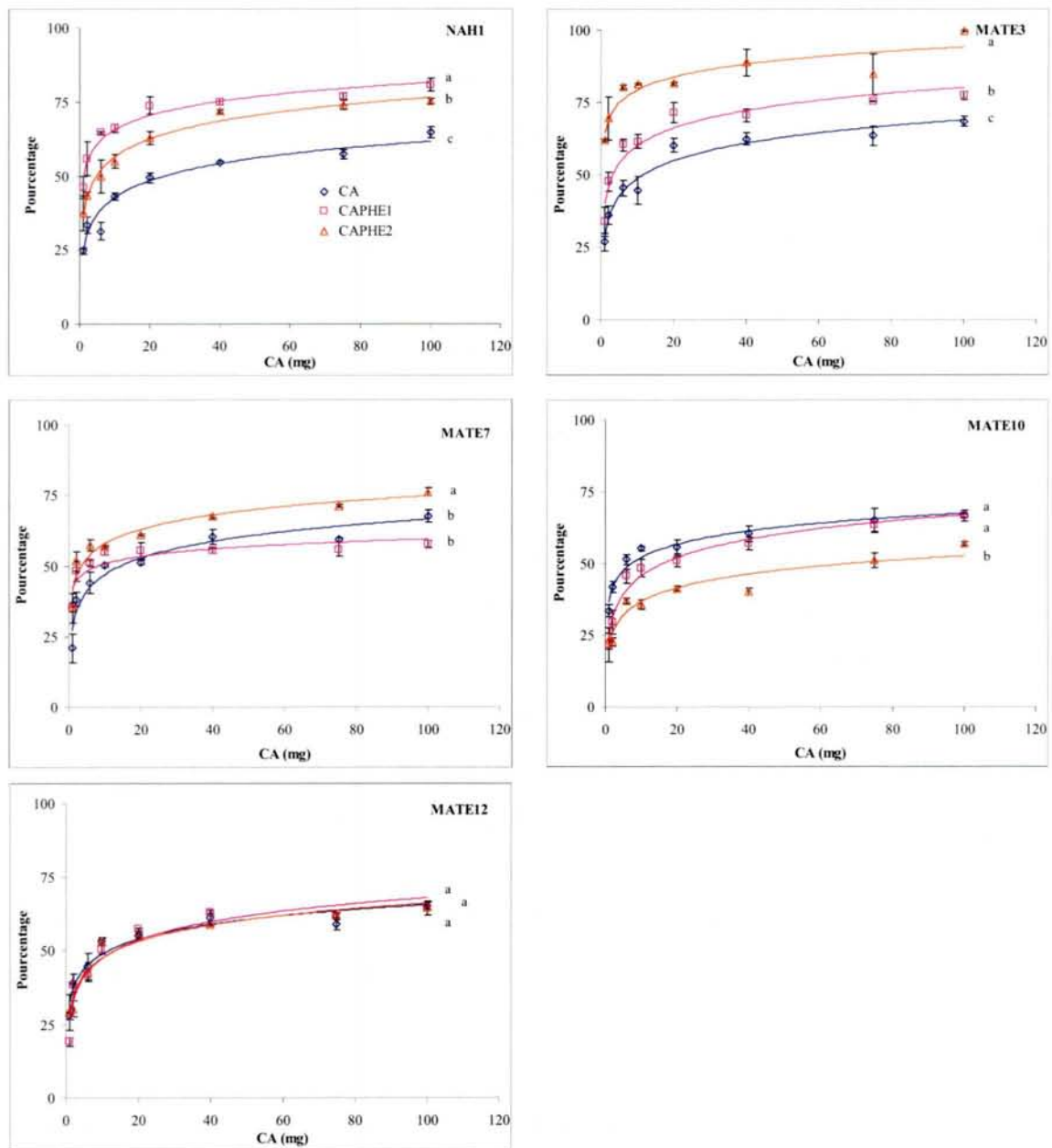


Figure 16. Adsorption bactérienne, exprimée en pourcentage de bactéries adsorbées sur charbon actif non recouvert (CA) ou recouvert par du phénanthrène (CAPHE1 : 800 mg CA / 2 mg PHE, CAPHE2 : 150 mg CA / 2 mg PHE). Moyenne et erreur standard (n=3).

Les essais réalisés avec CAPHE2 montrent une augmentation de l'adsorption dans le cas de la souche MATE3 par rapport aux résultats obtenus avec CAPHE1 (+ 22 % avec 100 mg de CA). Pour NAH1, la présence de PHE en plus grande quantité sur le CA a un effet significatif négatif sur l'adsorption des bactéries par rapport à CAPHE1. Cependant, la diminution observée entre CAPHE1 et CAPHE2 est faible (- 4 % avec 100 mg de CA), de plus le taux de bactéries adsorbées sur CAPHE2 est plus important qu'en absence de PHE (CA) (+ 10,5 % avec 100 mg de CA). Dans le cas de MATE7, une augmentation du pourcentage de bactéries adsorbées a été observée en présence de CAPHE2 par rapport à CA ou CAPHE1 (respectivement + 18 et + 8 %). Les essais réalisés avec MATE10 montrent une diminution significative du taux de bactéries adsorbées en présence de CAPHE2. La souche MATE12 ne semble pas affectée par la présence de PHE à la surface du CA.

L'adsorption de PHE sur le CA semble modifier les propriétés de surface du CA. Selon la souche bactérienne testée, la présence de PHE a ainsi montré un effet positif (NAH1, MATE3 et MATE7), négatif (MATE10) voire aucun effet (MATE12) sur l'adsorption bactérienne.

La Figure 16 ne prend pas en compte les modifications de la porosité du CA en présence de PHE (voir chapitre 3.1.2). A partir des données de porosimétrie au mercure, il est possible de calculer une surface accessible aux bactéries (Tableau 8). La présence de PHE adsorbé sur le CA réduit la surface accessible aux bactéries (-32 % pour CAPHE1 et -18 % pour CAPHE2). En prenant pour surface d'une bactérie $1 \mu\text{m}^2$, il est alors possible de calculer un taux de recouvrement. La représentation du taux de recouvrement en fonction de la concentration des bactéries en suspension à l'équilibre peut être modélisée grâce à un modèle de type Freundlich (voir chapitre 2.2.2.2). La Figure 17 représente le logarithme du taux de recouvrement en fonction du logarithme de la concentration de bactéries en suspension à l'équilibre. L'intervalle de confiance des droites de régression à 95 % est également représenté.

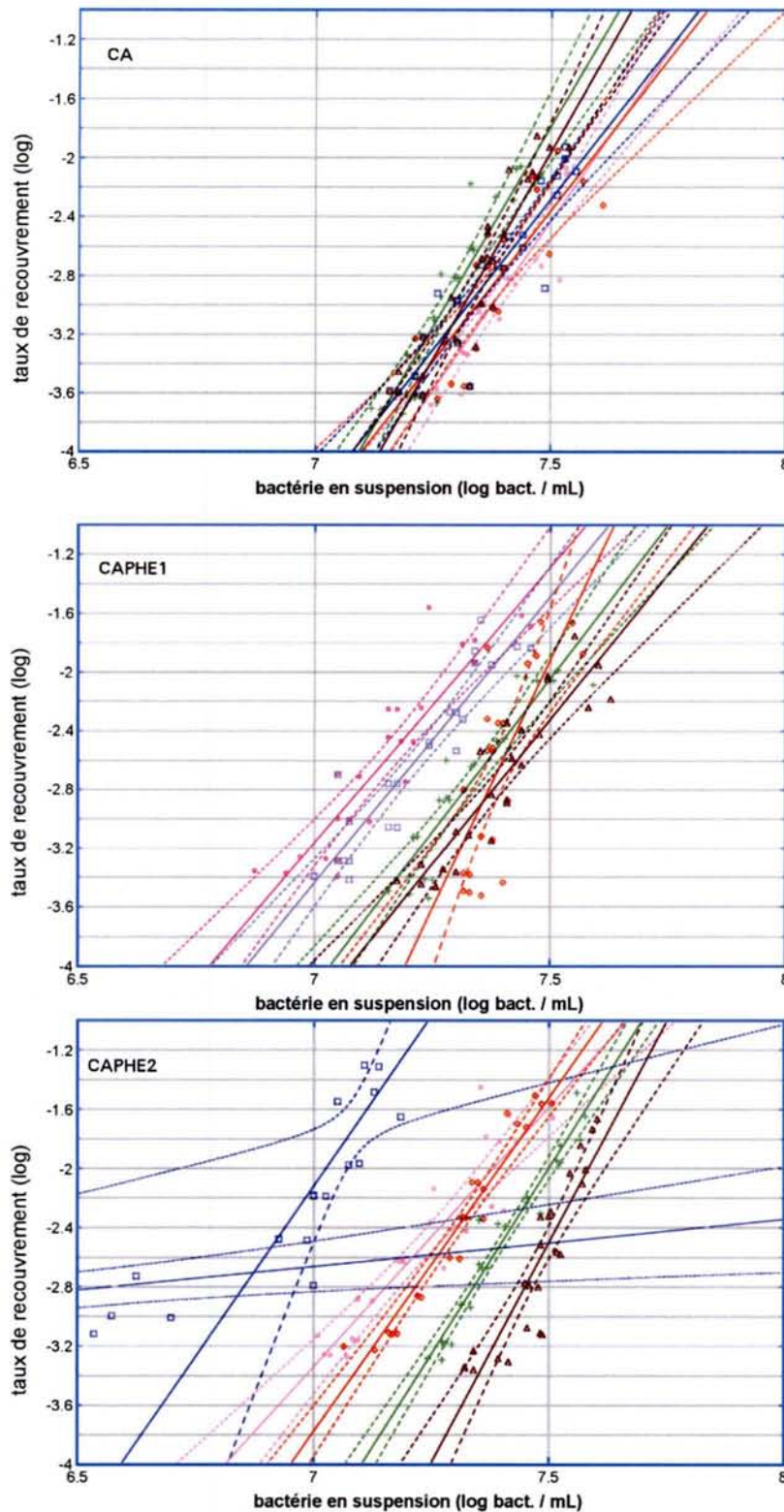


Figure 17. Taux de recouvrement bactérien sur le charbon actif non recouvert (CA), recouvert de PHE (CAPHE1 : 800 mg CA / 2 mg PHE, CAPHE2 : 150 mg CA / 2 mg PHE)

Les résultats obtenus montrent que le taux de recouvrement est faible, compris entre 0,02 % et 0,04 % avec les grandes quantités de charbon actif (100 mg), et entre 0,75 % et 3 % avec les plus petites quantités (1 mg). Dans le cas de MATE7, la Figure 16 montre une

adsorption similaire en présence de CA et CAPHE1. Or, la figure 17 montre que la courbe représentant l'adsorption bactérienne sur CAPHE1 présente deux parties. Pour les traitements contenant moins de 20 mg de CA, la présence de PHE accentue le taux de recouvrement de MATE7 (+ 154 % avec 1 mg et + 90 % avec 2 mg) alors qu'avec de plus grandes quantités de CA, l'effet du PHE est plus limité (+ 29 % avec 100 mg). En présence de CAPHE2, le taux de recouvrement de MATE7 est plus important que sur CAPHE1 et il est équivalent à celui de NAH1 (en présence de CAPHE1 ou CAPHE2) ou de MATE3 avec CAPHE1. En présence de CAPHE2 le taux de recouvrement observé pour MATE3 est plus important que dans le cas des essais réalisés avec CAPHE1.

Les essais d'adsorption des cinq souches sélectionnées sur du CA montrent que l'adsorption du PHE à la surface du matériau a un effet positif sur l'adsorption des souches MATE3, MATE7 et NAH1 alors que les souches MATE10 et MATE12 ne semblent pas affectées. Ces résultats pourraient être liés aux propriétés de surface de ces bactéries. C'est pourquoi une caractérisation de ces propriétés a été entreprise.

3.3.2 Caractérisation des propriétés des membranes bactériennes

Les mécanismes d'adsorption bactérienne sur des surfaces solides peuvent se diviser en deux étapes, une adhésion réversible due à des interactions à distance, suivie d'interactions à courte portée qui permettent le contact bactéries / surface telles que des interactions hydrophobes (Zylstra et Kim 1997). Le caractère hydrophobe des membranes bactériennes semble jouer un rôle dans sa capacité à s'adsorber sur une surface solide (de Mesquita *et al.* 2003, Zylstra et Kim 1997).

Afin de caractériser les membranes des cinq souches testées, des tests MATH (Microbial Adhesion To Hydrocarbon) mesurant l'affinité d'une bactérie pour une surface hydrophobe ont été réalisés. Les propriétés électrochimiques des surfaces bactériennes et du CA jouent également un rôle dans les mécanismes d'adhésion bactéries / matériau. Pour cela deux méthodes ont été utilisées : le titrage potentiométrique et la mesure du potentiel électrochimique. Ces mesures ont été effectuées sur les cinq souches bactériennes sur CA et sur CAPHE1 dans le cas du titrage potentiométrique et uniquement sur les cinq souches bactériennes pour le potentiel électrochimique.

3.3.2.1 Affinité vis-à-vis d'une surface hydrophobe (test MATH)

Deux hydrocarbures ont été utilisés pour réaliser les mesures d'affinité vis-à-vis d'une surface hydrophobe : le n-hexadécane (aliphatique) et le toluène (aromatique). Les résultats obtenus avec le n-hexadécane montrent une forte affinité des 5 souches bactériennes pour la phase organique (Figure 18). L'augmentation du volume de ce solvant organique se traduit par une augmentation du pourcentage de bactéries adhérentes. Ceci doit être dû à l'augmentation de la surface de contact lors de la phase d'agitation au cours de laquelle se forme une émulsion entre le solvant organique et la solution saline.

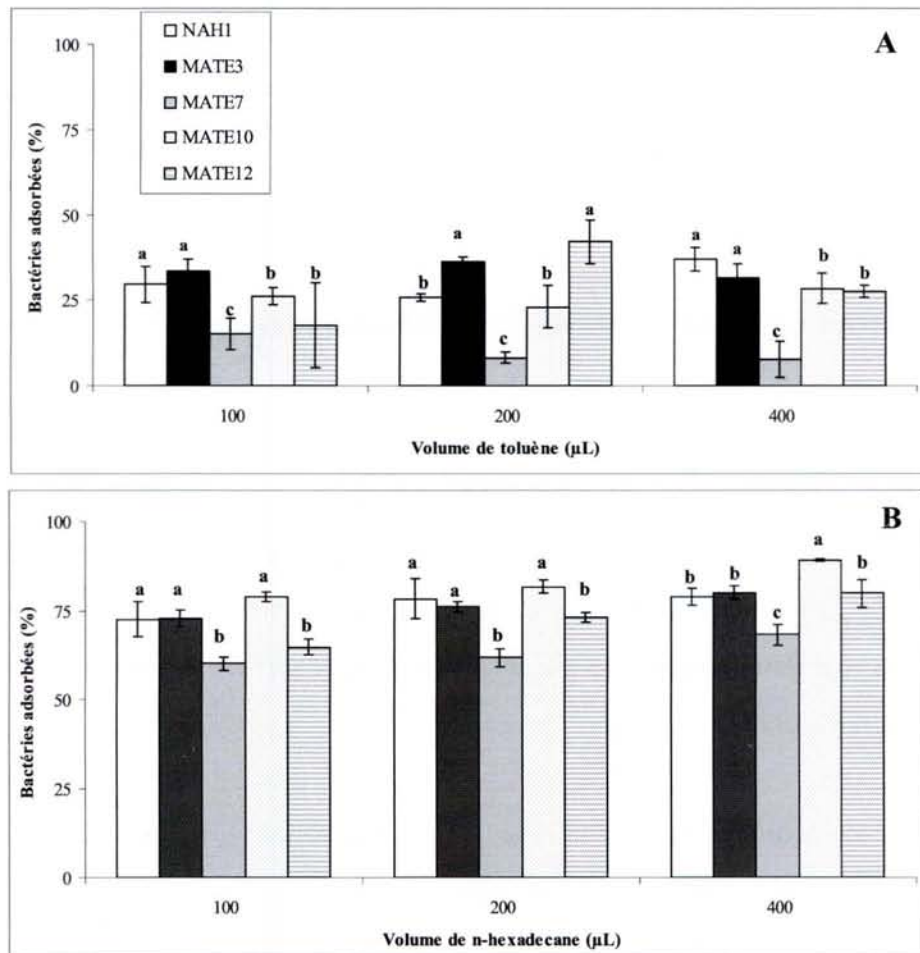


Figure 18. Pourcentage de bactéries adhérentes au toluène (A) ou au n-hexadécane (B). Moyenne et erreur standard (n=3).

Dans le cas des traitements avec le n-hexadécane, l'affinité des bactéries est significativement plus importante pour les souches NAH1, MATE3 et MATE10 avec 100 et 200 µL de solvant. La souche MATE7 présente l'affinité la plus faible pour les trois volumes

testés. En présence de toluène, le pourcentage de bactéries adhérentes est, dans tous les cas, significativement plus faible qu'avec le n-hexadécane, de 8 à 42 %. Les souches MATE3 et NAH1 présentent une affinité plus importante pour le toluène que les autres souches dans le cas des volumes 100 et 400 μL .

Pour le traitement avec 200 μL , le pourcentage de bactéries adhérentes est plus important pour les souches MATE3 et MATE12. Comme cela avait été observé avec le n-hexadécane, la souche MATE7 présente le pourcentage d'adsorption le plus faible. Pour les souches NAH1, MATE3, MATE10 et MATE12, le ratio entre le taux de bactéries adhérentes au n-hexadécane et celui obtenu avec le toluène est compris entre 1,7 et 3,6. Dans le cas de MATE7, l'écart est plus important et augmente avec le volume de solvant utilisé (3,9 avec 100 μL , 7,5 avec 200 μL et 8,7 avec 400 μL).

3.3.2.2 Mesures des potentiels électrocinétiques

Le test MATH est souvent utilisé pour mesurer l'hydrophobicité d'une membrane bactérienne (Achouak *et al.* 1994, Jenkins et Lion 1993). Cependant, des mesures de potentiels zéta réalisées sur des gouttes d'hydrocarbure (Busscher *et al.* 1995) montrent que ces gouttes présentent un caractère électronégatif pour des pH compris entre 2 et 9. Busscher *et al.* (1995) suggèrent que le test MATH permet de mesurer une affinité vis-à-vis d'une surface hydrophobe et non l'hydrophobicité. Cette affinité des bactéries pour une surface hydrophobe est la somme d'interactions de type van der Waals, électrostatiques, ainsi que des interactions hydrophobes qui peuvent agir comme des forces de répulsion ou d'attraction.

Des mesures de potentiel zéta ont été réalisées sur les cinq souches bactériennes. Ces mesures ont été réalisées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,125 M. la molarité utilisée est plus importante que celle habituellement trouvée dans la littérature (entre 10^{-2} et 10^{-3} M) (Achouak *et al.* 1994, Ahimou *et al.* 2001). La concentration du tampon correspond à celle utilisée lors des expériences de titrage potentiométrique afin d'avoir une force ionique équivalente dans les deux méthodes. L'évolution du potentiel électrocinétique en fonction du pH de la solution est représentée dans la Figure 19.

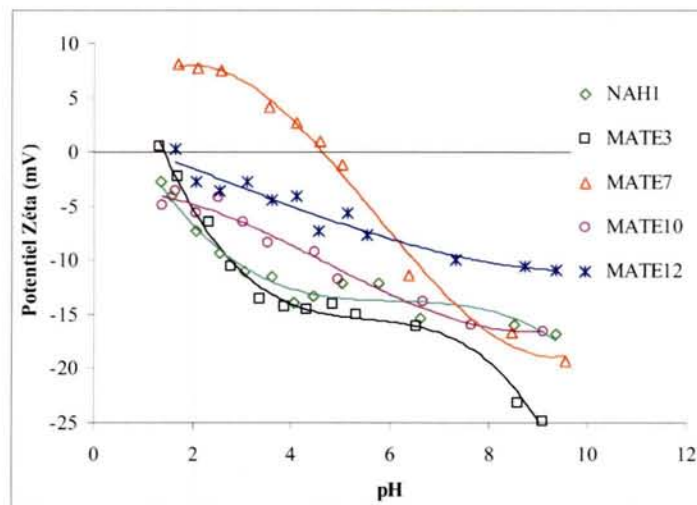


Figure 19. Evolution du potentiel zéta pour NAH1, MATE3, MATE7, MATE10 et MATE12 en fonction du pH.

La valeur 0 mV du potentiel zéta correspond au point isoélectrique (PIE) de chaque bactérie. Dans le cas des souches NAH1 et MATE10, le PIE est très acide et inférieur à 1,4. Pour MATE3 et MATE12 il est respectivement de 1,39 et de 1,66. La souche MATE7 présente un profil très différent avec un PIE plus élevé de 4,79. Les variations de potentiel zéta en fonction du pH sont fonction de la nature et de la distribution de certaines fonctions organiques à la surface des membranes bactériennes. Le tableau en annexe 2 récapitule un certain nombre de fonctions organiques qui peuvent être présentes à la surface des membranes bactériennes.

A partir des profils obtenus (Figure 19), il semble possible de distinguer trois groupes parmi les souches testées. Pour NAH1 et MATE3, le profil d'évolution du pKa en fonction du pH présente trois parties. Lorsque le pH passe de 1,5 à 4 le potentiel zéta chute rapidement. Ceci semble indiquer que leurs membranes bactériennes possèdent une majorité de groupements phosphoriques et carboxyliques qui sont dissociés. Entre pH 4 et pH 7, le potentiel zéta évolue peu. Au delà de pH 7, la dissociation des groupements amines accentue le caractère électronégatif des membranes bactériennes.

Dans le cas de MATE10 et MATE12, le profil d'évolution du potentiel zéta est plus linéaire. Les différences entre les pka des différents groupements sont moins franches. L'environnement chimique et physique (structure du radical R, encombrement stérique)

modifie le pKa d'une fonction organique. Les groupements organiques présents à la surface de ces deux souches semblent former un continuum de pKa. La souche MATE7 présente un profil très différent avec un PIE proche de 5. Sa membrane bactérienne semble très riche en groupements amines chargés positivement pour un pH inférieur à 5.

Lors des essais d'adhésion sur une surface hydrophobe, le pH de la solution saline se situait aux environs de pH 6,3. Pour un pH de 6, le potentiel zéta mesuré est compris entre -40 et -20 mV pour le n-hexadécane et entre -30 et -15 mV pour le toluène suivant le tampon utilisé (tampon phosphate et tampon phosphate additionné de chlorure de sodium) (Busscher *et al.* 1995). Les valeurs de potentiel zéta pour ce pH sont pour NAH1 -14,2 mV, MATE3 -15,9 mV, MATE7 -11,4 mV, MATE10 -13,4 mV et MATE12 -8,7 mV. Ces résultats montrent que les membranes des cinq souches testées possèdent une majorité de fonctions chimiques chargées négativement à pH 6,3 (phosphate, carboxylate). Ces fonctions sont présentes au niveau des lipopolysaccharides qui constituent en partie la membrane externe des bactéries gram négatives (Wilson *et al.* 2003). Au cours du test MATH, la membrane bactérienne et la surface du solvant organique sont chargées négativement. Les forces d'attraction doivent donc être plus importantes que les forces de répulsion électrostatique. Si les forces électrostatiques étaient les seules impliquées dans les mécanismes d'adhésion, plus le potentiel zéta de la souche est faible plus sa capacité d'adsorption devrait être limitée. Or, les cinq souches ont présenté des capacités d'adsorption importantes vis-à-vis du n-hexadécane. Ceci suggère que leurs membranes présentent des propriétés hydrophobes importantes. Les souches NAH1, MATE3 et MATE10 ont un potentiel zéta plus bas que MATE7 et MATE12, cependant leur capacité d'adhésion sur une surface hydrophobe est plus importante. Ceci semble indiquer que le principal élément intervenant dans leur mécanisme d'adhésion serait leur caractère hydrophobe. Dans le cas de MATE3 et de NAH1, ces résultats confirment les observations effectuées lors des essais d'adsorption sur CA/CAPHE1/CAPHE2. Pour MATE10, son caractère hydrophobe et les résultats des essais d'adsorption sur le charbon actif ne semblent pas corrélés.

Les souches NAH1 et MATE3 semblent donc présenter un caractère hydrophobe plus important que les souches MATE10 et MATE12 et surtout MATE7 (Figure 18). Comme cela a été dit précédemment, le pourcentage de bactéries adhérentes sur le toluène pour la souche MATE7 est le plus faible d'un facteur 4 à 8 par rapport aux essais réalisés avec le n-héxadécane. Les propriétés des membranes de cette souche, semblent donc différentes de celles observées pour les quatre autres souches.

3.3.2.3 Propriétés électrochimiques des surfaces étudiées

Le titrage potentiométrique acido-basique permet d'étudier la distribution des différentes acidités fortes, faibles et très faibles présentes à la surface d'un échantillon. La Figure 20 présente la distribution des acidités pour les cinq souches bactériennes ainsi que pour CA et CAPHE1.

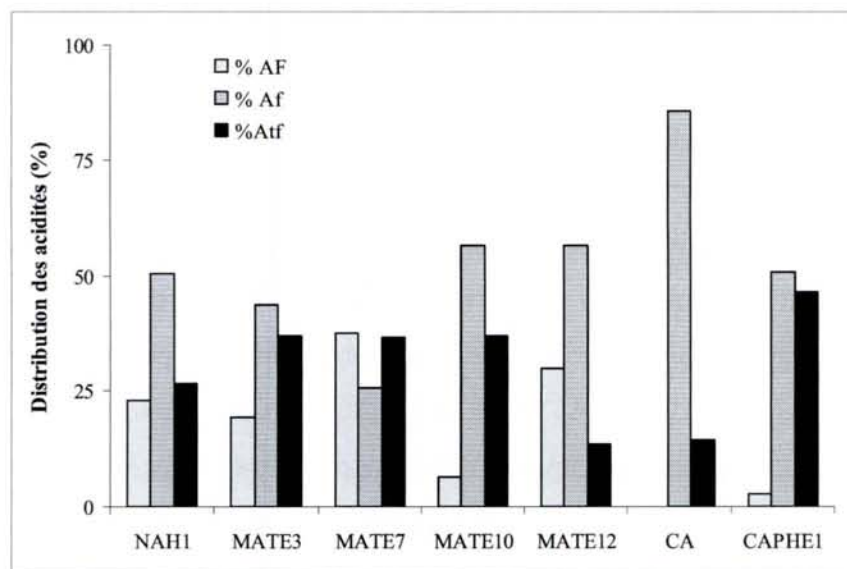


Figure 20. Distributions (%) des groupements d'acidités organiques fortes (AF), faibles (Af) et très faibles (Atf) des cinq souches bactériennes, du charbon actif non recouvert (CA) ou recouvert par du phénanthrène (CAPHE1 : 800 mg / 2 mg de PHE).

La distribution des groupements d'acidité est très hétérogène en fonction de la souche bactérienne. Dans le cas de MATE7, la proportion des trois domaines d'acidité est relativement similaire avec une contribution Af plus faible que AF et Atf. Avec des pH acide la balance des charges de surface (AF et Af neutre, Atf positive) pourrait expliquer les résultats au niveau du potentiel zéta. De plus la contribution acide de MATE7 en meq.g-1 est la plus importante (Tableau 11) ce qui pourrait expliquer l'écart important observé entre la

valeur maximale et la valeur minimale obtenues en potentiel zéta (27,4 mV). Les souches MATE10 et MATE12 présentent un contribution Af majoritaire par rapport à AF et Atf. Ceci pourrait expliquer le profil relativement linéaire obtenu en potentiel zéta. En effet, la dominance des Af pourrait masquer les domaines AF et Atf par rapport aux profils obtenus avec MATE3 et NAH1. Pour ces deux dernières souches, la contribution Af est également importante mais l'écart par rapport aux deux autres domaines est moins marqué que pour MATE10 et MATE12. Ceci pourrait expliquer le profil en sigmoïde obtenu en potentiel zéta.

Au niveau des contributions absolues (Tableau 11) de ces différents domaines d'acidité, la souche NAH1 et la souche MATE7 présentent les contributions les plus importantes, 4 à 5 fois plus importantes que pour les trois autres souches. Cependant, la faible biomasse mesurée pour ces deux souches pourrait expliquer l'écart important observé. Le charbon actif (CA ou CAPHE1) présente une contribution moins importante que les souches bactériennes avec un domaine AF très faible. L'adsorption du phénanthrène à la surface de CA modifie les caractéristiques acido-basiques du matériau, avec une augmentation de l'acidité totale. Celle-ci est liée à l'augmentation de la contribution Atf.

	AF (meq.g ⁻¹)	Af(meq.g ⁻¹)	Atf(meq.g ⁻¹)	AT(meq.g ⁻¹)
NAH1	2,64	5,83	3,07	11,55
MATE3	0,54	1,22	1,03	2,79
MATE7	5,06	3,47	4,97	13,50
MATE10	0,12	1,09	0,71	1,92
MATE12	0,97	1,83	0,43	3,23
CA	0,00	0,10	0,02	0,12
CAPHE1	0,00	0,09	0,08	0,18

Tableau 11. Distribution (meq.g⁻¹) des acidités fortes (AF), faibles (Af) et très faibles (Atf) des cinq souches bactériennes et du charbon actif non recouvert (CA) ou recouvert de PHE (CAPHE1 : 800 mg CA / 2 mg PHE).

A partir des courbes de titration, il est possible de calculer la valeur des pKa moyens des domaines Af et Atf, définis grâce à la méthode de Gran, par la méthode d'Henderson-Hasselbach. Cette méthode permet de calculer les coefficient de dissociation (α) du domaine Af ou Atf en fonction du pH. Le pKa moyen d'un domaine est déterminé lorsque α égal 0,5.

Les valeurs des pKa moyens déterminés pour les domaines Af et Atf sont regroupées dans le Tableau 12.

	pKa moyen	
	Af	Atf
NAH1	5,6 (2,4)	10,2 (1,7)
MATE3	6,8 (5)	10,7 (1,2)
MATE7	n.d.	n.d.
MATE10	3,7 (1,7)	6,2 (2,6) - 7,2 (4)
MATE12	n.d.	n.d.
CA	3,3 (1)	4,8 (0,2)
CAPHE1	4,3 (1,3)	8,9 (1)

Tableau 12. Détermination des pKa moyen des domaines d'acidité faible (Af) et très faible (Atf) pour les cinq souches bactériennes et le charbon actif recouvert (CAPHE1) ou non (CA) de PHE. Entre parenthèse, le nombre de protons échangés pour chaque pKa moyen.

Pour les souches MATE7 et MATE12, il n'a pas été possible de déterminer les pKa moyens. Pour ces deux souches, la forte contribution des acidités fortes, respectivement 37,5 et 30 %, pourrait expliquer la difficulté rencontrée au niveau de la méthode de calcul utilisée. En effet, lors du calcul du pKa moyen du domaine Af, on retranche la contribution AF, pour le calcul du α en considérant que cette contribution n'a pas de pKa. Cependant les courbes de titrage ont été réalisées de pH 2,7 à pH 11. Or, certains groupements fonctionnels peuvent avoir des pKa proches de 3, voire plus bas. Lors du calcul des domaines d'acidités avec la méthode de Gran, une partie de ces acides faibles n'a pas été titrée et a été considérée comme faisant partie du domaine AF. Cette sur-estimation de AF pourrait expliquer pourquoi il n'a pas été possible de déterminer de pKa moyen pour Af et Atf. Les souches MATE3 et NAH1 présentent des pKa moyens relativement proches et ce pour les deux domaines. Ceci pourrait indiquer que la composition de leur membrane est proche. Cependant la comparaison du nombre de protons échangés (méthode détaillée dans l'annexe 1), en particulier pour Af, indique qu'il existe des différences au niveau de l'expression des molécules présentes au niveau de leurs membrane. La souche MATE10, possède des pKa moyens beaucoup plus bas, sans doute liés à la dominance du domaine Af. Dans le domaine Atf, il a été possible de déterminer deux pKa semblant indiquer la présence de deux types de groupements fonctionnels. Pour les deux charbons actifs, le pKa moyen du domaine Af est également bas.

Pour CA, le deuxième pKa pourrait être considéré comme un deuxième pKa du domaine Af plutôt que comme un pKa du domaine Atf en raison du faible nombre de protons échangés (0,2). L'adsorption de PHE sur le CA, se traduit par une augmentation de la contribution Atf avec un pKa moyen aux environs de 8,9. Cette contribution acide, due au PHE, est surprenante en raison des propriétés chimiques du PHE. Elle pourrait être due à la présence d'électrons Π délocalisés au niveau des noyaux aromatiques qui induiraient un caractère électronégatif favorable à l'adsorption de proton.

L'utilisation de la procédure TDIS permet de déterminer des domaines d'affinité protonique à partir de la dérivée de la courbe de titrage en fonction du pH (Figure 21). Grâce à cette méthode, il est possible de déterminer des domaines d'affinité protonique, même pour les souches MATE7 et MATE12. Cependant, les valeurs obtenues sont très similaires entre les cinq souches avec au niveau des trois domaines déterminés, des valeurs de pKa aux environs de 4,5 pour le premier domaine, 7,5 pour le deuxième domaine et 10,5 pour le troisième domaine. La présence de PHE adsorbé sur le CA se traduit par la présence d'un domaine supplémentaire en milieu basique avec un pKa de 9,1 qui avait également été observé par la méthode d'Henderson. L'observation de l'évolution de la dérivée de la courbe de titrage montre, pour les souches NAH1, MATE3 et particulièrement pour MATE7 et MATE12, la présence d'un épaulement pour les pH initiaux (2,7 à 3,7). Cette épaulement montre la présence de groupements en cours de protonation dont le pKa serait inférieur à 2,7. Ceci confirme la sur-estimation des AF par la méthode de Gran au cours de cette étude. Cette surestimation pourrait être également due à un rinçage insuffisant des biomasses après le conditionnement en milieu acide.

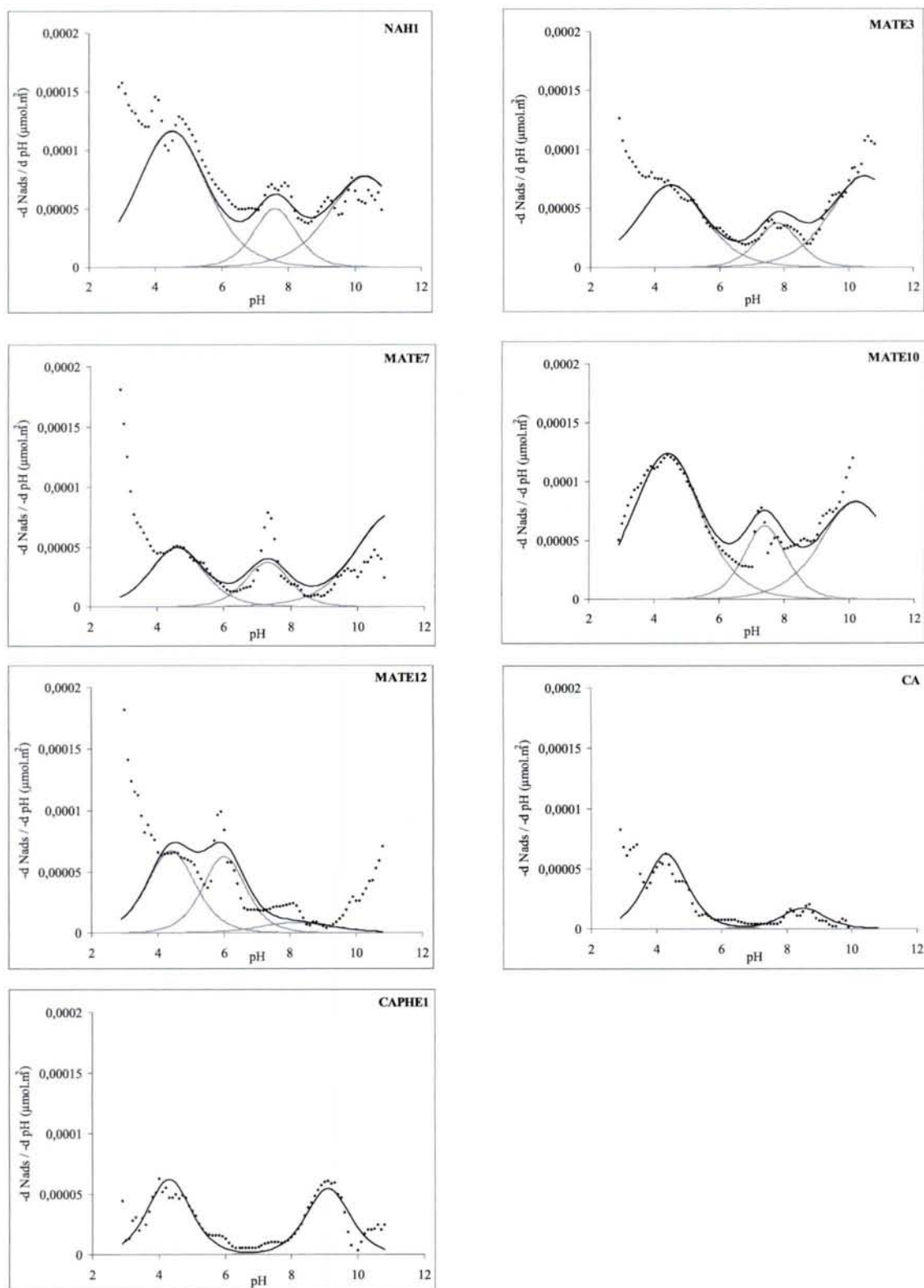


Figure 21. Distribution des affinités protoniques pour les souches bactériennes et le charbon actif recouvert (CAPHE1) ou non (CA) de PHE exprimée en dérivée de l'isotherme de l'adsorption de OH^- en fonction du pH.

3.3.3 Conclusion du chapitre

L'adsorption des souches bactériennes sur le charbon actif est dépend des propriétés des membranes bactériennes et de la présence de PHE adsorbé à la surface du charbon actif. Parmi les cinq souches testées, les trois souches produisant des biopolymères (NAH1, MATE3 et MATE7) présentent une capacité d'adsorption plus importante sur le charbon actif lorsque celui-ci est recouvert de PHE. Pour les souches MATE10 et MATE12 la présence de PHE n'a pas d'effet sur les mécanismes d'adsorption. La présence de ces biopolymères à la surface des membranes bactériennes des souches NAH1, MATE3 et MATE7 doit favoriser les interactions hydrophobes avec le PHE adsorbé.

L'affinité des bactéries vis-à-vis d'une surface hydrophobe, mesurée grâce au test MATH, montre qu'elles présentent toutes une forte affinité pour les surfaces hydrophobes. Cependant, la souche MATE7 présente l'affinité la plus faible ce qui ne correspond pas aux résultats observés avec les isothermes d'adsorption. L'utilisation des méthodes de titrage potentiométrique montre que les cinq souches bactériennes présentent des propriétés acido-basiques variables d'une souche à l'autre. Cependant, des regroupements peuvent être faits entre les souches NAH1 et MATE3, d'une part, et MATE10 et MATE12, d'autre part, qui présentent des caractères communs au niveau de leur propriétés acido-basiques. La souche MATE7 a des caractéristiques très particulières au niveau de sa membrane comme cela a été observé lors du titrage potentiométrique et de la mesure du potentiel zéta.

La capacité d'adsorption des bactéries sur le charbon actif peut jouer un rôle important dans les mécanismes de dégradation du phénanthrène en présence de ce matériau. De plus dans un système dynamique, le devenir de l'inoculum bactérien est influencé par la capacité d'adsorption des bactéries (Huysman et Verstraete 1993). Dans le chapitre suivant, la capacité des cinq souches bactériennes, produisant ou non des biopolymères, à dégrader le PHE a été étudiée.

3.4 Effet de l'inoculum bactérien sur la biodégradation du phénanthrène

Les essais d'adsorption des 5 souches bactériennes sélectionnées ont montré que deux groupes se distinguaient, qui correspondaient à leur capacité à produire ou non des biopolymères : NAH1, MATE3 et MATE7 dont l'adsorption sur le CA est plus importante en présence de PHE et MATE10 et MATE12 qui ne sont pas affectées par la présence du phénanthrène à la surface du charbon actif. Des essais de biodégradation en batch en présence ou en absence de CA ont été réalisés avec ces cinq souches pour vérifier si les résultats obtenus avec NAH1 (voir chapitre 3.2.3) étaient dépendants de la souche utilisée.

3.4.1 Effet de la souche bactérienne

Ces essais ont été réalisés avec du phénanthrène non marqué. Les conditions expérimentales, notamment la préparation des batch et de l'inoculum ont été similaires à celles de l'expérience décrite au chapitre 3.2.3. Cependant, la quantité de CA apportée a été moins importante (20 mg au lieu de 50 mg) afin d'obtenir un pourcentage initial de PHE en solution plus important. L'incubation a été réalisée sur une période de 72 jours.

Les taux de minéralisation du phénanthrène ont varié de 11,3 % pour NAH1 en absence de CA à 33,9 % pour MATE7 en présence de CA (Figure 22). Dans le cas des traitements avec NAH1 et MATE7, la présence de charbon actif a augmenté significativement la dégradation du PHE par rapport aux traitements sans CA, respectivement de 7,8 % et 13,4 %. Pour MATE3, les résultats montrent également un taux de dégradation plus important en présence de CA (+ 4,4 %) mais cette différence n'est pas significative au seuil de 5 %. L'ajout de CA n'a pas eu d'effet sur la minéralisation de PHE par MATE12. Dans le cas de MATE10, la présence de CA semble avoir un effet négatif sur la minéralisation de PHE (- 6,7 % après 72 jours d'incubation).

Les observations réalisées en microscopie confocale sur les grains de CA prélevés dans les différents traitements confirment la présence de biofilm pour les souches NAH1, MATE3 et MATE7 (Figure 22). Dans le cas des souches MATE10 et MATE12, aucune structure de ce type n'a pu être observée.

La quantité de PHE minéralisée dans les traitements avec MATE10 et MATE12 est du même ordre de grandeur avec ou sans CA. Weissenfels *et al.* (1992) ont observé des résultats similaires lors d'essais de dégradation d'un mélange de HAP dans deux sols par un consortium bactérien autochtone. Dans le cas des souches NAH1, MATE3 et MATE7, leur capacité à produire des biopolymères leur permet de dégrader le phénanthrène à un taux plus important en présence de CA. Pour NAH1, les résultats obtenus sont similaires à ceux de l'expérience précédente (Figure 14).

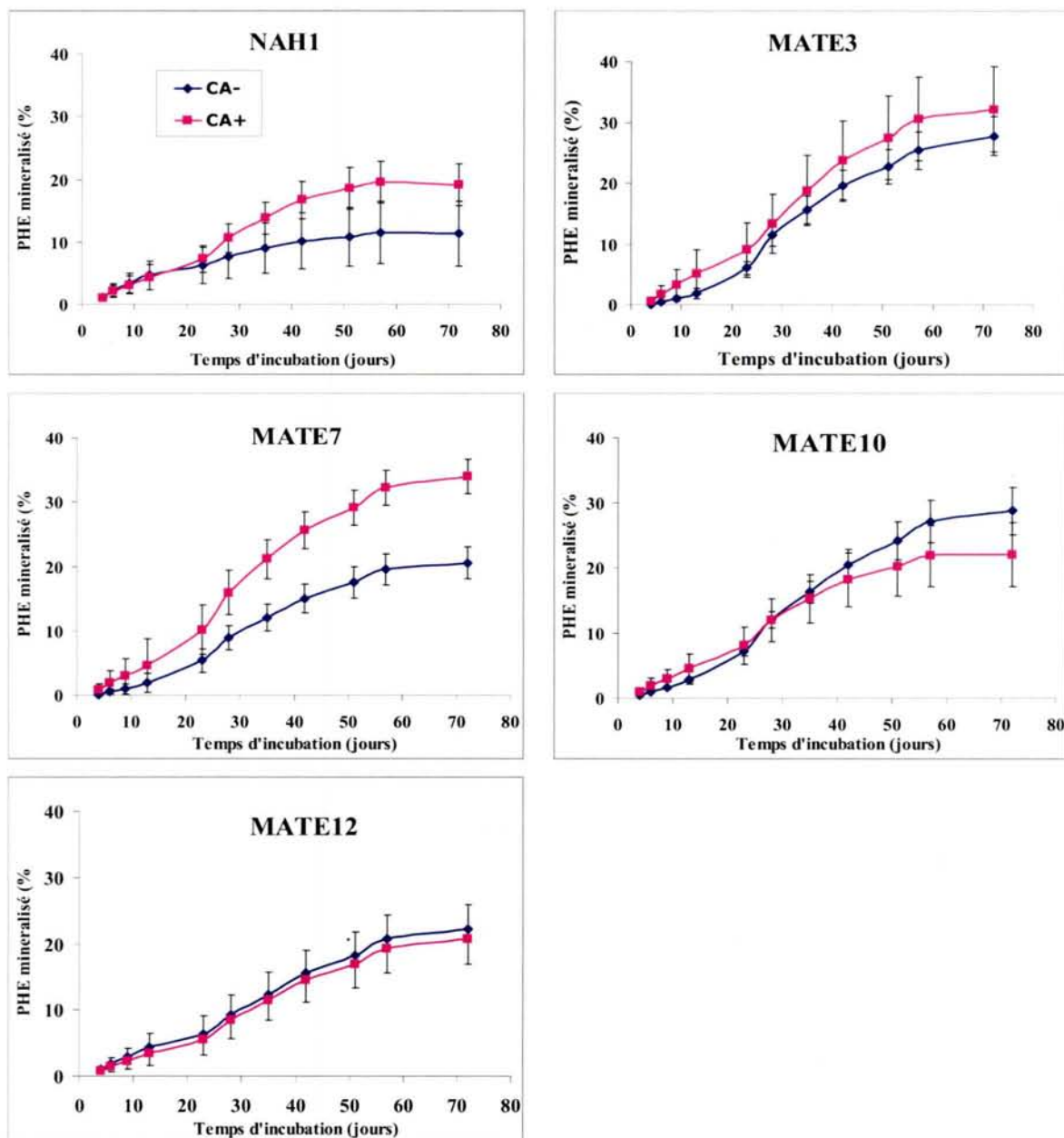


Figure 22. Minéralisation de PHE en réacteurs fermés par 5 souches bactériennes dégradantes, en absence (CA-) et en présence de charbon actif (CA+). Moyenne et erreur standard (n=3).

La comparaison des résultats obtenus avec ceux décrits dans le chapitre 3.2.3 montre un temps d'incubation trois fois plus important pour atteindre un palier de minéralisation lors des essais avec du phénanthrène non marqué. De plus, le temps de latence pour NAH1, de 8 jours lors du premier essai, est de 23 jours ici. Ces différences peuvent être dues au fait que les techniques utilisées pour estimer la minéralisation ne sont pas identiques. En effet, dans le premier cas, c'est le $^{14}\text{C-CO}_2$, directement issu de la minéralisation du PHE, qui est dosé alors que lors de la deuxième expérience, la mesure du CO_2 rend compte du CO_2 gazeux total présent dans le réacteur. De plus, le comptage en scintillation liquide est plus sensible que la mesure réalisée à l'aide du spectromètre infrarouge. Les mesures réalisées lors de la deuxième expérience peuvent également prendre en compte l'autominéralisation de la biomasse, ce qui pourrait retarder le plateau de dégradation.

Pour les souches NAH1 et MATE3, plusieurs mécanismes peuvent expliquer l'effet positif de CA sur la dégradation de PHE. Les essais d'adsorption de ces deux souches sur le CA ont montré un effet positif du PHE sur l'adsorption des bactéries. Cette plus forte affinité permet à un plus grand nombre de bactéries d'entrer en contact avec le PHE adsorbé. Cette accès direct au substrat favoriserait la mise en place de gradients locaux qui pourraient expliquer le taux plus important de PHE biodégradé en présence de CA. Les essais réalisés par Harms et Zehnder (1994) sur la biodégradation du dibenzofurane et du 3-chlorodibenzofurane montrent que l'adsorption des bactéries favorise la formation d'un gradient de concentration entre la surface du CA et les bactéries. Des essais de dégradation du phénanthrène en présence de sédiments marins (Poeton *et al.* 1999) ont montré un taux de dégradation plus important en présence de sédiment associé à une augmentation du nombre de bactéries adsorbées par rapport au sédiment sans PHE. Avec MATE3, aucun temps de latence n'a été observé par rapport à l'effet du CA sur la dégradation du PHE contrairement au traitement avec NAH1. Ceci pourrait être dû au fait que le taux d'adsorption de MATE3 sur le CA est plus important et plus sensible à la présence de PHE à la surface du CA. Les observations réalisées après 72 jours d'incubation (Figure 23) montrent que la répartition des souches MATE10 et MATE12 à la surface de CA semble plus homogène par rapport aux trois autres souches, qui se présentent plutôt sous forme de paquets, ce qui pourrait constituer un avantage lors de la biodégradation de PHE. Cependant, la répartition de PHE à la surface du CA n'est pas homogène (résultats non présentés) et, sur certaines observations, correspond à la localisation des souches NAH1, MATE3 et MATE7.

En présence de CA dans les traitements inoculés par MATE7, le taux de dégradation du PHE est augmenté de 13,4 %, ce qui représente l'augmentation la plus importante. Lors des expériences d'adsorption de MATE7 sur le charbon actif recouvert par du PHE dans des conditions (rapport solide / liquide) équivalentes à celles utilisées lors de cette expérience de biodégradation, aucune modification du pourcentage de bactéries adsorbées n'a été observée en fin d'expérience. Cependant, pour les plus petites quantités de CAPHE1, la présence de PHE augmentait le taux de recouvrement par MATE7, ce qui pourrait favoriser les échanges PHE adsorbé – MATE7. Des différences en terme de composition du biofilm entre ces trois souches pourraient expliquer les variations observées sur leur capacité à utiliser le PHE adsorbé.

La mesure des vitesses de dégradation du PHE dans les différents traitements montre que, pour MATE7, la vitesse de minéralisation du phénanthrène est toujours plus importante en présence qu'en absence de CA (Tableau 13). Dans le cas de NAH1, l'effet du CA sur la dégradation a été observé après un temps de latence de 23 jours, alors que pour MATE3 l'effet positif a été observé surtout au début de l'incubation. Dans le cas de MATE12, les vitesses de dégradation sont équivalentes en présence ou en absence de CA. Pour MATE10, la présence de CA semble limiter la dégradation du PHE adsorbé en fin d'incubation. Ceci semble indiquer que la biodégradation par MATE10 est limitée par la vitesse de désorption.

Temps d'incubation (jours)	4	6	9	13	23	28	35	42	51	57	72
NAH1	2,9 (-12)	5,6 (-1)	3,5 (-8)	3,4 (-10)	1,5 (98)	2,9 (124)	1,9 (137)	1,6 (155)	0,8 (169)	1,1 (46)	0
MATE3	0,1 (1558)	2,3 (144)	1,8 (175)	2,1 (125)	4,2 (-6)	10,9 (-21)	5,8 (34)	5,7 (23)	3,5 (18)	4,4 (17)	1,5 (-3)
MATE7	0,1 (3189)	2,5 (115)	1,5 (120)	2,4 (66)	3,4 (66)	7,2 (61)	4,4 (67)	4,2 (51)	2,8 (38)	3,4 (-57)	0,7 (71)
MATE10	1,1 (110)	2,4 (116)	2,4 (32)	2,9 (40)	4,4 (-18)	9,8 (-20)	6,1 (-23)	5,9 (-30)	4,1 (-46)	5 (-42)	1,1 (-8)
MATE12	2,6 (-21)	4,3 (-18)	3,3 (-25)	3,8 (-22)	2 (4)	5,6 (4)	4,5 (-1)	4,7 (-7)	2,9 (-12)	4,1 (-6)	1 (3)

Tableau 13. Vitesse de dégradation de PHE ($\mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$) en absence de CA ; entre parenthèse figure, en pourcentage, l'augmentation (+) ou la diminution (-) de la vitesse de dégradation en présence de CA.

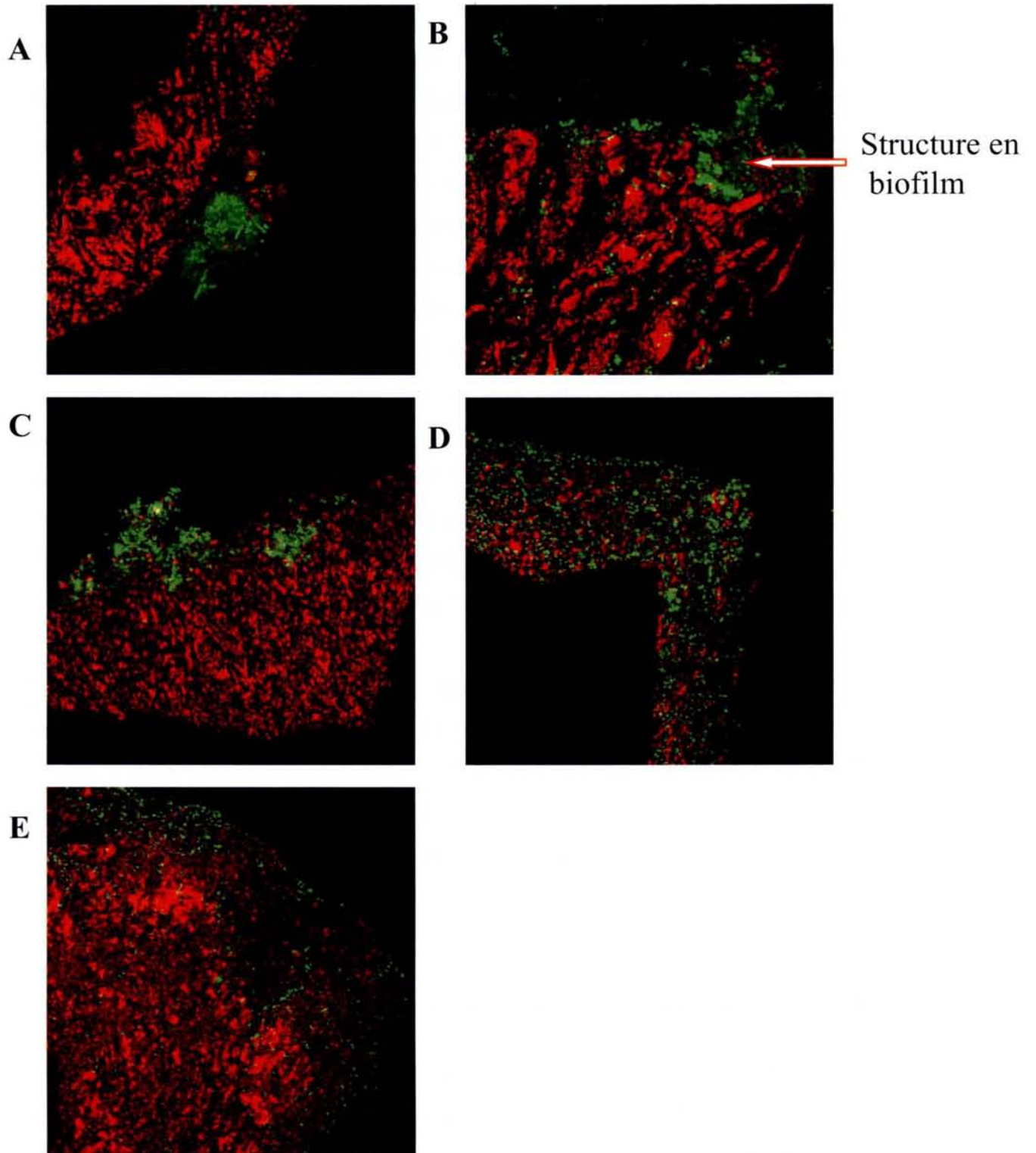


Figure 23. Observations en microscopie confocale de bactéries (en vert) à la surface de grains de charbon actif (en rouge) recouvert de PHE, formant (A, B,C) ou non (D,E) des biofilms après 72 jours d'incubation. NAH1 (A), MATE3 (B), MATE7 (C), MATE10 (D), MATE12 (E).

Le calcul des vitesses de dégradation en absence de CA montre que les souches MATE3 et MATE10 sont les plus efficaces, suivies de souches MATE7 et MATE12. NAH1 a été la souche la moins rapide à dégrader le phénanthrène. Les résultats obtenus au cours de cette expérience montrent que les propriétés des souches bactériennes interviennent dans leur capacité à dégrader le phénanthrène dans un système PHE / CA. Les 3 souches sélectionnées pour leur capacité à produire des biofilms correspondent aux souches ayant un taux de minéralisation du PHE plus important en présence de charbon actif. Cependant, les mécanismes impliqués pourraient ne pas être les mêmes pour chacune de ces souches. Pour ces souches, les mécanismes d'adsorption sur CA semblent jouer un rôle prépondérant favorisant des phénomènes de dégradation directe du PHE adsorbé. De même, la formation d'un biofilm, pourrait contribuer à expliquer leur capacité à dégrader le PHE adsorbé. Cependant pour chaque souche, la prédominance d'un mécanisme par rapport à l'autre n'a pas pu être établi. La cinétique de dégradation du PHE adsorbé par MATE10 semble limitée par les phénomènes de désorption du PHE, ce qui n'est pas le cas pour MATE12.

La capacité à produire des biopolymères pourrait permettre aux souches MATE3, MATE7 et NAH1 de dégrader le PHE adsorbé en présence de CA à un taux plus important que celui en absence de matériau. Ces biopolymères pourraient agir comme des biosurfactants favorisant la solubilisation du PHE. C'est pourquoi un suivi de la répartition du PHE dans les différents compartiments du réacteur a été réalisé lors de la troisième expérience de biodégradation.

3.4.2 Effet de la production de biopolymères sur la biodégradation de PHE

L'expérience précédente a montré que les souches bactériennes ayant la capacité de produire des biofilms dégradaient une quantité plus importante de PHE en présence de CA. Les souches bactériennes utilisées pour ces essais, NAH1 et MATE10, ont été choisies car elles se différenciaient au niveau de la production de biofilm et par rapport aux résultats obtenus lors des essais de biodégradation du phénanthrène et d'adsorption des bactéries sur charbon actif, qui montraient une forte adsorption de NAH1 sur CAPHE qui conduisait à une augmentation de la dégradation de PHE, tandis que pour MATE10, la dégradation de PHE n'a pas été influencée par son adsorption sur CA. Cette expérience avait pour objectif d'étudier l'effet de la présence de CA sur la répartition du PHE : adsorbé, en solution et minéralisé. De

plus, le suivi du recouvrement du CA par les deux bactéries a été réalisé grâce à des observations en microscopie confocale.

Le suivi du $^{14}\text{C-CO}_2$ (Figure 24) confirme les résultats obtenus lors des deux premières expériences de biodégradation, c'est à dire un effet positif de la présence de CA sur la biodégradation de PHE par NAH1 et un effet négatif significatif pour MATE10. La plus petite quantité de CA utilisée dans cette expérience par rapport aux précédentes a permis d'augmenter le pourcentage initial de PHE en solution qui était d'environ 4 %. Dans le cas de MATE10, le traitement sans CA atteint un plateau après 12 jours d'incubation, alors qu'en présence de CA celui-ci se situe à 19 jours. Ceci semble confirmer que la capacité de cette souche à dégrader le PHE adsorbé sur le CA est limitée par des mécanismes de désorption du phénanthrène.

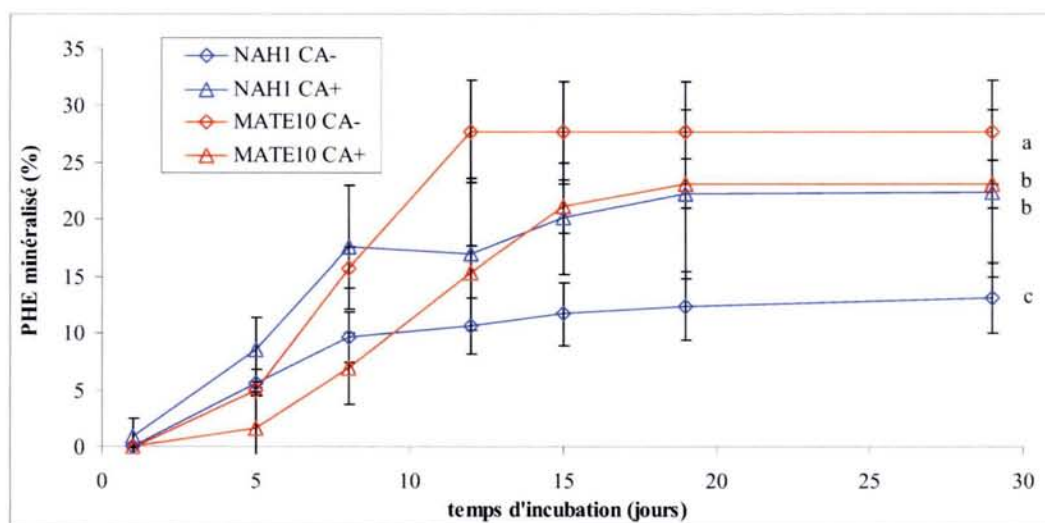


Figure 24. Minéralisation du PHE en réacteurs fermés par 2 souches bactériennes dégradantes en absence de charbon actif (CA-) ou en présence de charbon actif (CA+). Moyenne et erreur standard (n=3).

Après 8 jours d'incubation, le taux de minéralisation le plus important correspond au traitement contenant NAH1 et du CA. Ceci pourrait être dû à sa plus grande adsorption sur le CA (Figure 25). Les résultats concernant le nombre de bactéries en suspension (Figure 25) et donc leur adsorption sur CA sont tout à fait concordants avec ceux obtenus lors des essais d'adsorption de ces deux souches sur des gradients de CA. Les résultats de minéralisation, après 29 jours d'incubation, montrent que malgré l'effet du CA sur NAH1, sa capacité de minéralisation est au mieux équivalente à celle de MATE10.

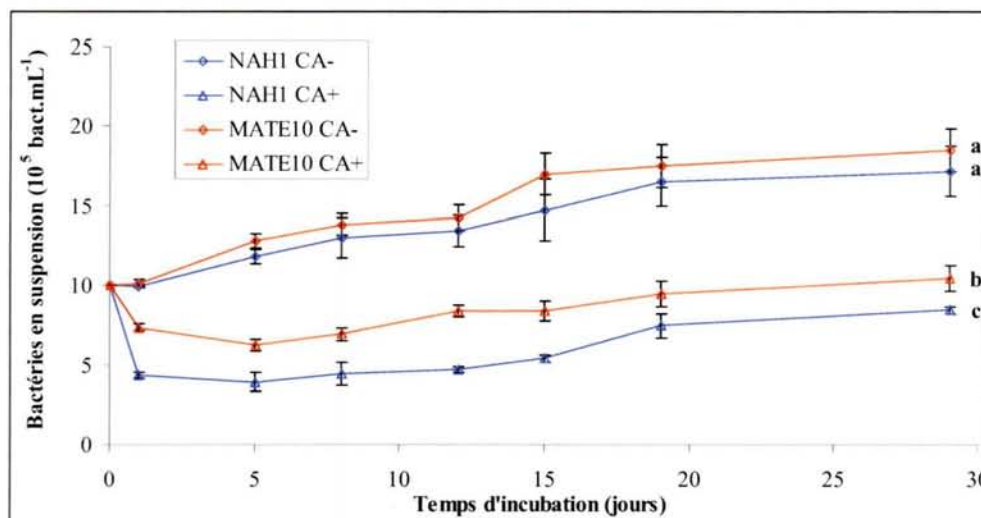


Figure 25. Suivi du nombre de bactéries en suspension dans les traitements inoculés avec NAH1 ou MATE10, en absence de CA (CA-), en présence de CA (CA+). Moyenne et erreur standard (n=3).

Au cours de l'incubation, un bilan du PHE en solution, adsorbé sur CA et minéralisé a été réalisé après 1, 8, 15 et 29 jours d'incubation (Figure 26). Les résultats obtenus montrent qu'au cours de l'expérience environ 20 % du PHE ajouté n'a pas été retrouvé. Cette fraction pourrait correspondre au PHE adsorbé sur les réacteurs (verreries, septum...). La quantité de PHE en solution est faible et inférieure à 3 % de la quantité initiale. Ceci indique que les phénomènes d'adsorption sur le CA ont pu se poursuivre au delà des 48 heures initiaux de contact PHE / CA. Les mesures de l'activité en solution dans les traitements inoculés avec NAH1 montrent une augmentation du pourcentage de PHE en solution qui passe de 2,1 % (t_1) à 3 % (t_{15}). Dans le cas des traitements avec MATE10, le pourcentage de PHE en solution à t_1 (2,6 %) est significativement plus important que pour NAH1. Au cours de l'expérience ce pourcentage tend à diminuer : 1,5 % à t_8 , 1,5 % à t_{15} et 1,2 % à t_{29} . Ces valeurs sont significativement plus faibles que celles obtenues avec NAH1 pour t_8 , t_{15} et t_{29} .

Pour NAH1, entre t_1 et t_8 , le PHE minéralisé (18,6 %) provient majoritairement du compartiment adsorbé qui, au cours de la même période, a diminué de 28,4 %. Le PHE non dégradé venant du compartiment adsorbé est resté en solution (+1 %) ou s'est adsorbé sur les parois du réacteur (+9 %). Entre t_8 et t_{15} , le taux de minéralisation est inférieur à 4 % ce qui correspond à la diminution de PHE adsorbé. Dans le cas de MATE10, la comparaison, entre chaque bilan, du pourcentage de PHE adsorbé et du pourcentage de PHE minéralisé montre une efficacité de la souche MATE10 supérieure à NAH1. En effet, le taux de dégradation du

PHE provenant du compartiment adsorbé est supérieur à 80 % pour MATE10 alors que pour NAH1 celui-ci est toujours inférieur à 75 %.

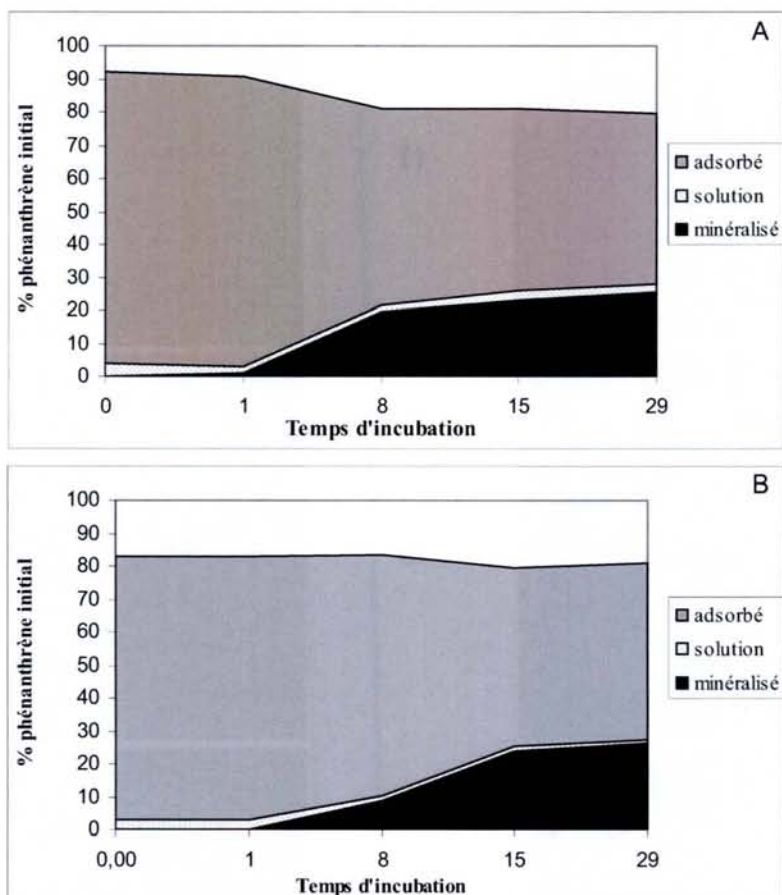


Figure 26. Bilan du PHE au cours des essais de biodégradation, (A) NAH1, (B) MATE10. Moyenne (n=3) pour chaque compartiment.

Les observations réalisées en microscopie confocale montrent une répartition différente de NAH1 et MATE10 à la surface du CA dès le début de l'incubation (Figure 27). NAH1 se structure en agrégats et forme des biofilms visibles après 8 jours d'incubation. La répartition de MATE10 est homogène avec quelques agrégats de petites tailles.

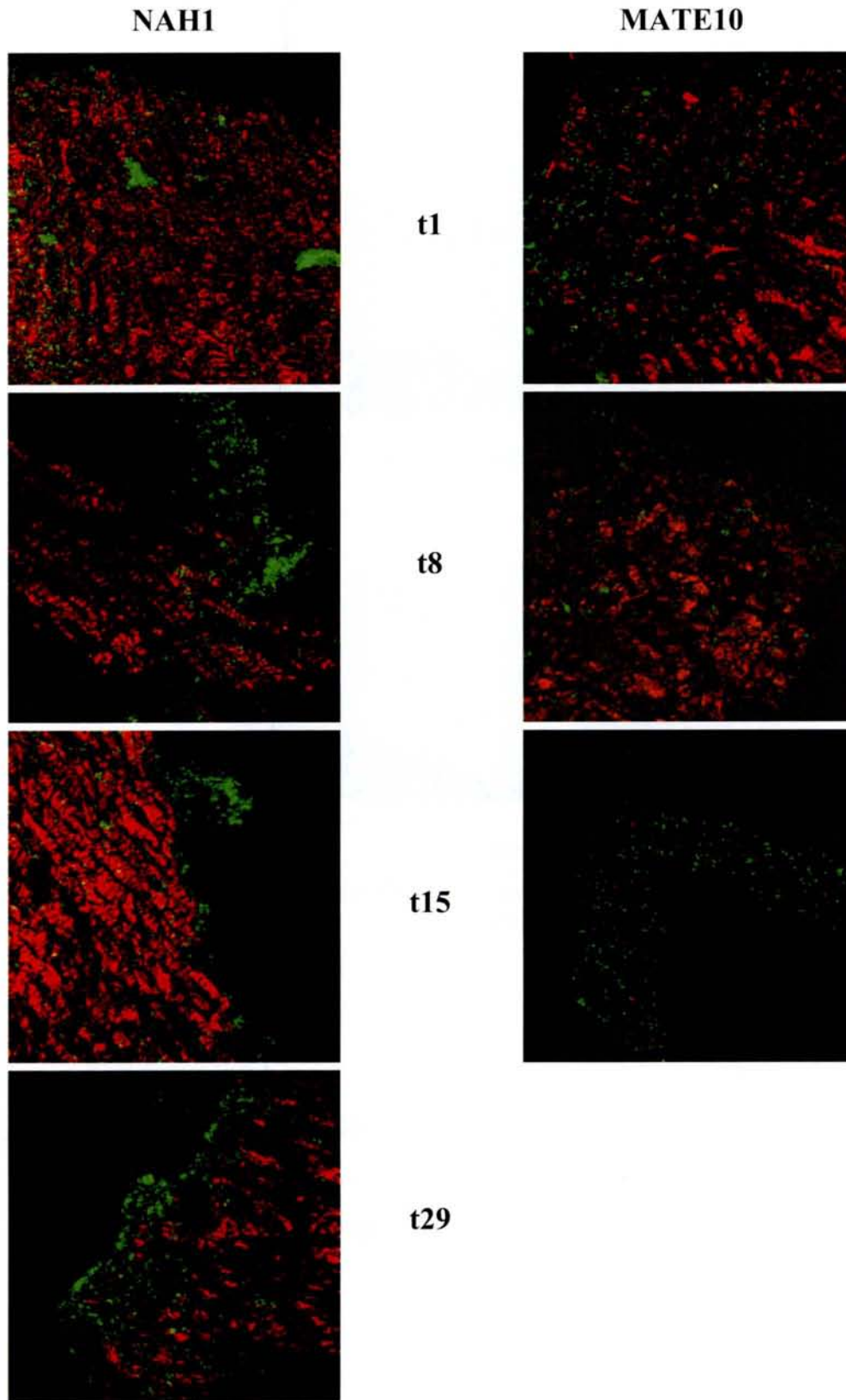


Figure 27. Observations par microscopie confocale de bactéries (en vert) à la surface de grains de charbon actif (en rouge) recouvert de PHE après 1 (t1), 8 (t8), 15 (t15), 29 (t29) jours d'incubation.

3.4.3 Conclusion du chapitre

Les résultats obtenus au cours des expériences de biodégradation ont montré que les interactions phénanthrène / matériau / bactéries étaient primordiales dans les mécanismes de dégradation du PHE. En effet, la présence d'une phase solide sur laquelle le PHE pouvait s'adsorber, modifiait les capacités de dégradation d'une bactérie dégradante. Dans le cas du CA, la comparaison de la biodégradation de PHE par différentes souches dégradantes montre que l'effet dû à la présence de CA est dépendant des propriétés de la souche testée.

Une souche bactérienne capable de produire des biopolymères et de se structurer en biofilm semble plus apte à dégrader le PHE adsorbé sur une surface solide. Le suivi de la concentration de PHE en solution montre une augmentation de celle-ci dans les traitements inoculés avec NAH1 qui produit des biopolymères. La présence de ces composés organiques doit accentuer les mécanismes de désorption de PHE en favorisant sa solubilisation. La capacité métabolique des 5 souches testées n'est pas la même. En absence de CA, les MATE3 et MATE10 sont les plus efficaces, en présence de CA se sont les souches MATE7 et MATE3 qui dégradent la plus grande quantité de PHE en 72 jours d'incubation.

Les résultats obtenus en réacteurs fermés sont à confirmer lors d'essais en colonne. En effet, ce système dynamique permet de se rapprocher des conditions d'utilisation d'une BPR. De plus, l'utilisation de colonnes permettra de tester l'effet des biopolymères sur l'hydrodynamique du système. En effet, la formation de biofilm pourrait réduire la perméabilité d'une BPR.

3.5 Adsorption et biodégradation du phénanthrène dans un système dynamique

Ces essais avaient pour objectif d'étudier la capacité de fixation de PHE par le charbon actif (CA) et sa biodégradation dans un système dynamique. En effet, les résultats d'adsorption du phénanthrène (PHE) obtenus en réacteurs fermés peuvent sous-estimer la capacité de rétention du charbon actif dans un système en colonne. La présence d'un inoculum bactérien pourrait également modifier le pouvoir de rétention du phénanthrène. De plus, ces essais avaient pour objectif de préciser l'effet de la croissance de l'inoculum bactérien sur les caractéristiques hydrodynamiques de la colonne en particulier les risques de colmatage. Comme dans le chapitre 3.4.2, les souches NAH1 et MATE10 ont été utilisées. Quatre expériences en colonnes ont été effectuées :

- Une colonne en conditions abiotiques témoin (C1)
- Deux colonnes inoculées avec NAH1 (C2 et C3)
- Une colonne inoculée avec MATE10 (C4)

Remarque : Des incidents techniques survenus lors de la réalisation des colonnes et au niveau du fonctionnement des pompes HPLC utilisées, n'ont pas permis de réaliser davantage d'expériences en colonne.

Dans le cas des colonnes inoculées avec NAH1, deux expériences ont été réalisées en saturant tout d'abord la colonne avec du PHE avant d'ajouter l'inoculum bactérien (protocole A voir chapitre 2.2.4.2) ou en introduisant l'inoculum bactérien avant le PHE (protocole B voir chapitre 2.2.4.2). Pour la souche MATE10, l'expérience a été réalisée selon le premier protocole.

3.5.1 Adsorption du phénanthrène

Les essais en batch ont montré que le charbon actif présente une capacité importante d'adsorption du phénanthrène. A partir des résultats des isothermes d'adsorption du

phénanthrène sur le charbon actif et de certaines caractéristiques de la colonne : dimensionnement, débit d'alimentation, concentration en PHE, volume poreux, masse volumique du charbon actif, il est possible d'estimer la concentration théorique en PHE à la sortie de la colonne en fonction du temps. Pour cela, le code de calcul Impact a été utilisé comme modèle mathématique de transfert d'une molécule organique dans un système en colonne. Les calculs ont été faits avec les données suivantes :

- ↳ La colonne est assimilée à 20 mélangeurs en cascade, valeur fixée de manière arbitraire.
- ↳ La solution d'alimentation ne contient que du phénanthrène (concentration équivalente à 90 % de la solubilité), il n'y a pas de réaction au cours de l'expérience et le débit d'alimentation est fixé à 1 mL.mn^{-1} .
- ↳ La colonne ne contient pas de phénanthrène initialement.
- ↳ Le rapport volume poreux (V_p) sur volume total (V) est de 0,66.
- ↳ La masse volumique du charbon actif est de $0,33 \text{ kg.L}^{-1}$.
- ↳ Les dimensions de la colonne sont : diamètre 2 cm - hauteur 10 cm.

L'évolution théorique de la concentration en phénanthrène en sortie de colonne, exprimée par rapport à la concentration en PHE entrant dans la colonne (C_0), en fonction du volume de solution (Figure 28) apportée montre que du phénanthrène devrait commencer à sortir de la colonne après le passage de $500 V_p$, soit 10 L de solution et que la saturation de la colonne devrait être atteinte après $700 V_p$, soit 14 L de solution. Avec un débit d'alimentation de 1 mL.mn^{-1} les volumes d'alimentation estimés correspondent à 7 et 9 jours d'alimentation en continu.

Les résultats obtenus pour les colonnes C1, C2 et C4 (Figure 29) ont montré un temps de rétention beaucoup plus important que celui estimé grâce au code de calcul Impact. Dans le cas des colonnes C1, C2 et C4 la concentration en phénanthrène était inférieure à la limite de détection au cours de 25 premiers jours d'incubation. Pour ces trois colonnes, il a fallu environ 70 jours pour atteindre un palier au niveau de la concentration en PHE en sortie de colonne.

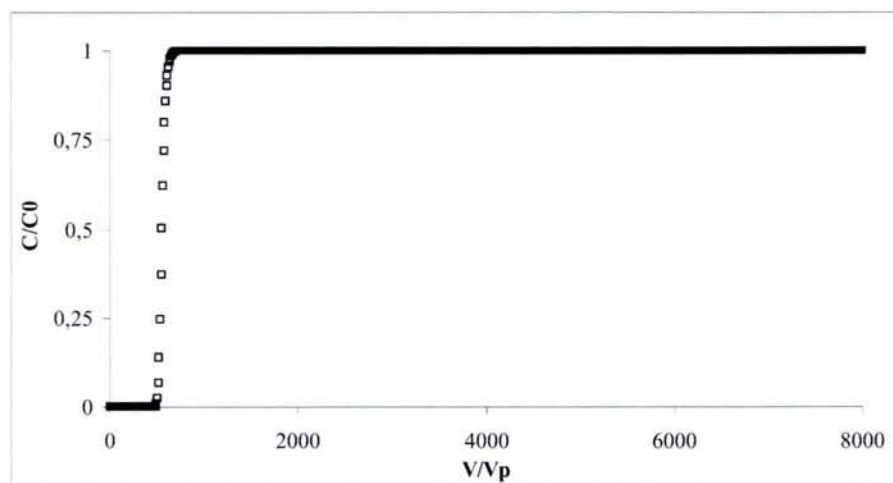


Figure 28. Evolution théorique, fournie par le code de calcul Impact, de la concentration en PHE en sortie de colonne en fonction du volume de solution apportée.

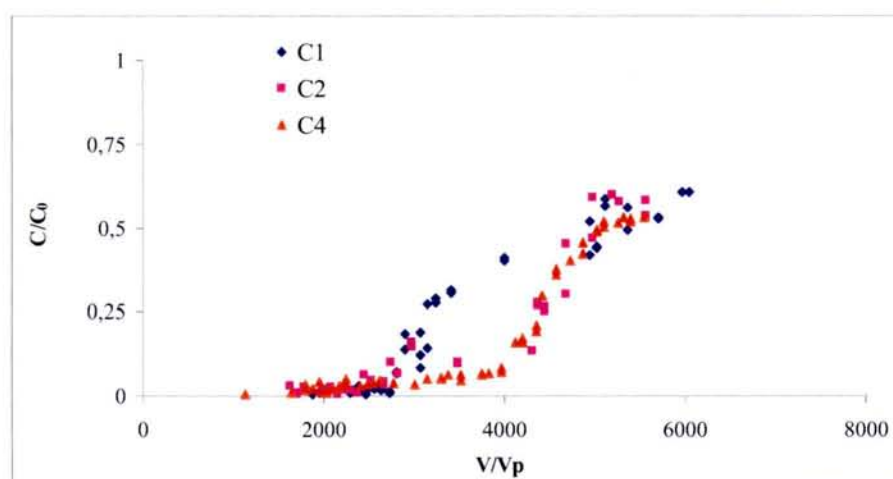


Figure 29. Evolution de la concentration en phénanthrène à la sortie des colonnes C1, C2 et C4 en fonction du volume d'alimentation.

Dans un système dynamique, le charbon actif semble donc présenter une capacité de rétention plus importante du phénanthrène qu'en batch. L'extrapolation des résultats d'adsorption obtenus en batch grâce au modèle de calcul Impact conduit à sous-estimer le temps de rétention du phénanthrène. Des résultats similaires ont été obtenus lors d'essais d'adsorption du benzène sur un mélange de charbon actif en poudre et de sable (Rael *et al.* 1993). Des essais en colonnes avaient montré une efficacité de rétention près de 40 % plus importante par rapport aux modélisations réalisées à partir des résultats d'essais en batch : temps de rétention observé en colonne de 37 jours, pour un temps estimé de 22 jours. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette différence. Tout d'abord les essais en batch ont été réalisés avec des concentrations initiales plus faible que celle utilisée pour l'alimentation des colonnes ($< 400 \mu\text{g.L}^{-1}$). L'utilisation d'une concentration initiale en PHE

plus importante pourrait modifier les paramètres K_f et n du modèle de Freundlich utilisé lors des essais en batch. Les calculs réalisés avec le code de calcul Impact ont été faits dans l'hypothèse de l'équilibre local. Il ne tient pas compte d'éventuelles déformations du front liées à l'hydrodynamique et à la cinétique de transfert. Ceci pourrait également expliquer en partie l'écart observé entre la prédiction du modèle et les résultats obtenus.

Pour les trois colonnes, le palier n'atteint pas une valeur de $C/C_0 = 1$ correspondant à une concentration en sortie de colonne équivalente à celle de la solution d'alimentation. En effet, la concentration maximale en PHE en sortie de colonne est d'environ $600 \mu\text{g.L}^{-1}$. Des dosages de la concentration en PHE dans le flacon d'alimentation, après trois jours de contact solution / parois du flacon, ont montré une légère baisse ($900 \mu\text{g.L}^{-1}$) de celle-ci. Cette période correspond au temps de renouvellement du flacon. Ceci pourrait être dû à des phénomènes d'adsorption de PHE sur les parois du flacon comme cela avait été observé lors de la réalisation des isothermes d'adsorption de PHE sur les différents matériaux testés. Des mécanismes similaires d'adsorption sur les différents constituants du système (tubulures, flacons de récupération) pourraient expliquer l'écart observé par rapport à $C/C_0 = 1$.

En fin d'expérience, un bilan du phénanthrène adsorbé sur le charbon actif dans chacune des trois sections a été réalisé (Tableau 14). Dans le cas de la colonne C1, pour laquelle aucune inoculation bactérienne n'a été effectuée, un gradient de concentration a été observé entre les sections S1, S2 et S3. La zone la plus saturée en phénanthrène correspond à la première section par laquelle le PHE entre dans la colonne. En comparant les quantités apportées et récupérées à la sortie de la colonne aux quantités extraites dans la colonne en fin d'expérience (S1+S2+S3), une différence de 7% apparaît qui peut être liée à des pertes ou à une faible dégradation. La majorité du phénanthrène a été adsorbée sur le charbon actif, en particulier dans les trois premiers centimètres de la colonne.

	quantité de PHE (mg) et concentration de PHE ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
	C1	C2	C3	C4
entrant (E)	102,24 (1)	165,6 (1)	145,44 (1)	106,56 (1)
sortant (S)	24,27 (607)	38,83 (297)	2,37 (16,57)	13,87 (475)
S1	58,8 (20,28)	11,97 (3,74)	1,13 (0,35)	70,84 (20,24)
S2	13,941 (4,50)	0,8562 (0,03)	0,02 (0,006)	2,44 (0,76)
S3	0,06 (0,02)	2,70 (0,60)	0,005 (0,002)	0,03 (0,007)
$\frac{(E-S) - (S1+S2+S3)}{(E-S)}$	7	88	99	21

Tableau 14. Bilan du phénanthrène apporté (entrant), élué (sortant), et adsorbé dans la section S1 S2 et S3 après 71 (C1), 115 (C2), 101 (C3) et 88 jours (C4).

3.5.2 Effet de l'inoculum bactérien sur le devenir du phénanthrène

L'inoculation des colonnes C2, C3 et C4 par les souches NAH1 et MATE10 modifie le bilan du phénanthrène (Tableau 14). Dans le cas de la colonne C2, l'inoculation de la colonne a été réalisée après 75 jours d'incubation lorsque le palier de concentration de PHE avait été atteint. Aucun effet de l'inoculation bactérienne sur la concentration en PHE à la sortie de la colonne n'a été observé pendant les 10 premiers jours après l'inoculation (Figure 30). Cette période de latence a dû correspondre au temps de colonisation de l'inoculum dans la colonne. A la suite de ce temps de latence, la concentration en PHE a diminué progressivement pendant environ 15 jours pour atteindre $300 \mu\text{g.L}^{-1}$. Cette diminution de la concentration en sortie de la colonne peut être attribuée à des mécanismes de biodégradation de PHE à l'intérieur de la colonne. Après cette période de 15 jours la concentration en phénanthrène en sortie de colonne s'est stabilisée et a atteint un nouveau palier. L'essai a alors été arrêté et un bilan de PHE a été réalisé (Tableau 14). Les résultats obtenus montrent, comme pour la colonne C1, un gradient de concentration entre les sections S1, S2 et S3. Cependant les quantités mesurées sont beaucoup plus faibles que celle obtenues pour C2. Plus de 80 % du phénanthrène adsorbé sur CA au cours de la première phase de saturation de la colonne, ont été biodégradés par NAH1 après 40 jours d'incubation.

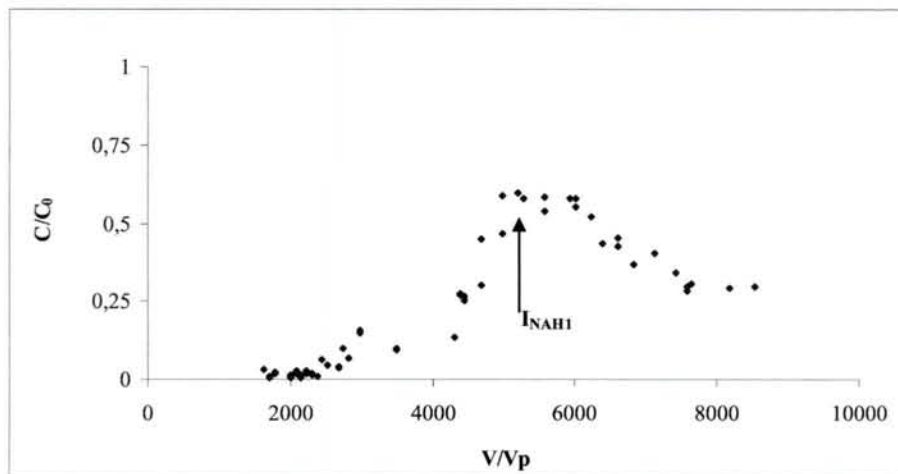


Figure 30. Evolution de la concentration en phénanthrène à la sortie de la colonne C2 inoculée après 75 jours avec la souche NAH1 (I_{NAH1}) en fonction du volume d'alimentation.

Pour la colonne C4, l'essai a dû être stoppé, suite à un percement de la colonne, 12 jours après son inoculation par la souche MATE10. Aucune modification sensible de la concentration en PHE en sortie de la colonne (Figure 31) n'a pu être observée au cours de la période qui a suivi l'inoculation.

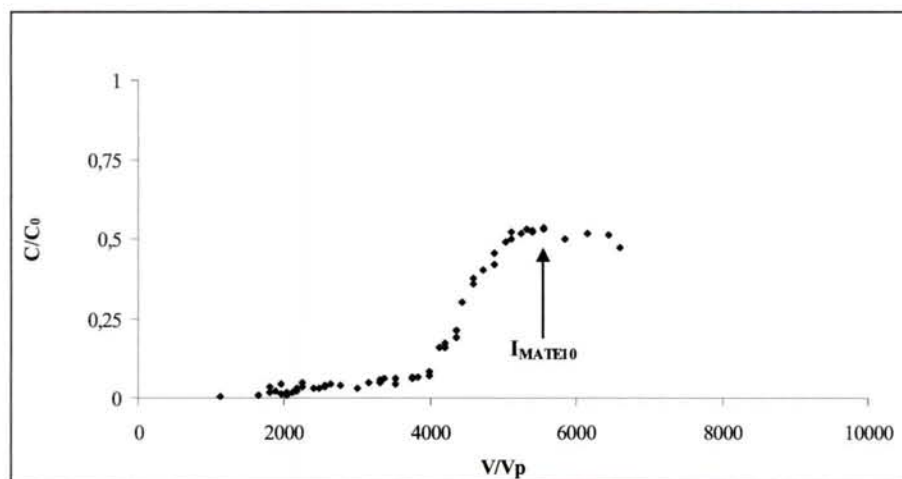


Figure 31. Evolution de la concentration en phénanthrène à la sortie de la colonne C4 inoculée après 71 jours avec la souche MATE10 (I_{MATE10}) en fonction du volume d'alimentation

Le bilan du phénanthrène montre que le phénanthrène est principalement adsorbé au niveau de la section S1 (Tableau 14). Près de 21 % du phénanthrène ajouté n'a pas été retrouvé dans ce bilan. Ceci suggère que cette fraction du phénanthrène a été dégradée par MATE10.

La comparaison de C2 et C4 montre que le temps de saturation de la colonne en PHE est compris entre 68 et 75 jours. Après l'inoculation, un temps de latence, correspondant à la colonisation de la colonne par les microorganismes, a été observé. L'arrêt prématuré de C4 n'a pas permis d'observer l'effet de l'inoculation par MATE10 sur la concentration en PHE en sortie de colonne. Cependant, les bilans du phénanthrène réalisés sur les deux colonnes montrent une biodégradation du phénanthrène adsorbé. Dans le cas de MATE10, 20% de PHE adsorbé dans la colonne a été dégradé en 12 jours. Pour NAH1, près de 80% de PHE adsorbé a été dégradé en 40 jours. Ces deux colonnes ont été réalisées suivant un protocole similaire : saturation de la colonne en PHE puis inoculation par une souche dégradant le phénanthrène. Dans le cas de la colonne C3, l'inoculation par NAH1 a été réalisée au début de l'expérience afin d'étudier l'effet de la présence de bactéries sur la rétention du phénanthrène. Après 100 jours d'expérience, la concentration en PHE en sortie de la colonne est faible, inférieure à $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figure 32). De plus, le bilan en PHE montre que la quantité adsorbée dans la colonne est la plus faible des 4 colonnes réalisées. La présence initiale de NAH1 affecte la rétention de PHE dans la colonne en retardant le temps de sortie du phénanthrène et en limitant la quantité de PHE adsorbée.

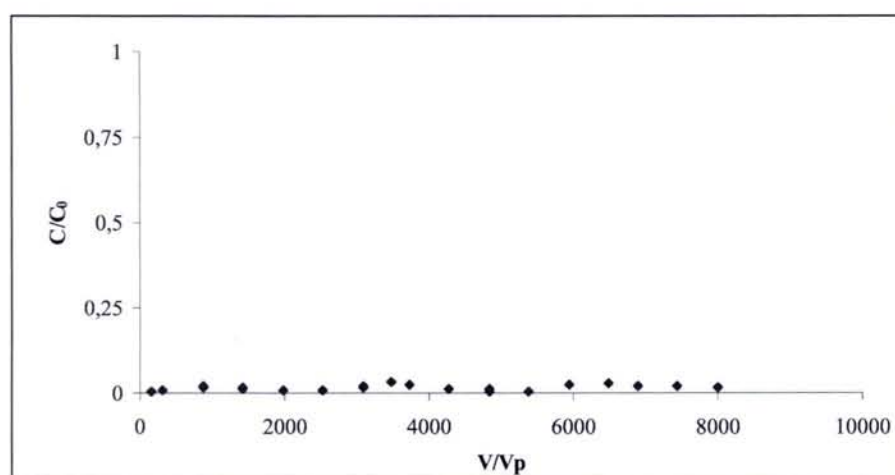


Figure 32. Evolution de la concentration en phénanthrène à la sortie des colonnes C3 en fonction du volume d'alimentation.

La croissance de l'inoculum au sein de la colonne a contraint à l'arrêt de l'expérimentation afin d'éviter un risque de surpression au niveau de la pompe FPLC. Ceci n'a pas permis de suivre l'évolution de la concentration de PHE au delà de 101 jours d'incubation.

3.5.3 Devenir de l'inoculum bactérien au sein d'un système dynamique

Plusieurs aspects ont été étudiés au niveau de l'évolution de l'inoculum bactérien :

- ↳ Comparaison de la saturation de la colonne en bactéries
- ↳ Suivi de la croissance de l'inoculum au cours de l'expérience

Le Tableau 14 montre le pourcentage de bactéries adsorbé après chaque injection de bactéries dans la colonne. Les résultats montrent que la saturation de la colonne en bactéries a été rapide pour les trois colonnes. Le pourcentage de bactéries adsorbées suite à la troisième injection était compris entre 5 et 7 %, après la cinquième injection il a été inférieure à 2 %. La comparaison des résultats obtenus au niveau des trois colonnes confirme les observations réalisées lors des mesures d'isotherme d'adsorption de NAH1 et MATE10 sur CA (Tableau 15):

- ↳ En présence de phénanthrène à la surface du charbon actif, l'adsorption de NAH1 est plus importante par rapport aux résultats obtenus avec du charbon actif seul.
- ↳ L'adsorption de MATE10 sur du charbon actif recouvert de PHE a été plus faible que celle observée pour NAH1.

	Bactéries adsorbées (%)		
	C2 (NAH1)	C3 (NAH1)	C4 (MATE10)
1ere injection	64	29	25
2ème injection	22	24	18
3ème injection	7	6	5
4ème injection	2	4	2
5ème injection	2	2	0
6ème injection	1	n.d.	n.d.
Bactéries totales adsorbées	9,83E+08	6,50E+08	5,13E+08

Tableau 15. Suivi de la saturation des colonnes C2, C3 et C4 par un inoculum bactérien

Par rapport aux isothermes d'adsorption de NAH1 et MATE10 sur un gradient de CA (voir chapitre 3.3.1), le taux de bactéries adsorbées est plus faible. Ceci pourrait être dû à un temps de contact plus court lors des essais en colonne. Les risques de colmatage liés à la croissance bactérienne au sein d'une Barrière Perméable Réactive ont également été étudiés lors des essais en colonne. Au niveau des pompes d'alimentation, une diminution de la

perméabilité se traduit par une augmentation de la pression d'injection de la solution afin de maintenir le débit à 1 mL.mn^{-1} . L'évolution de la pression au cours de l'incubation a donc permis, de manière directe, de suivre la réduction de la perméabilité due à la croissance bactérienne dans la colonne. Ce suivi a été réalisé pour les colonnes C2 et C3 (Figure 33).

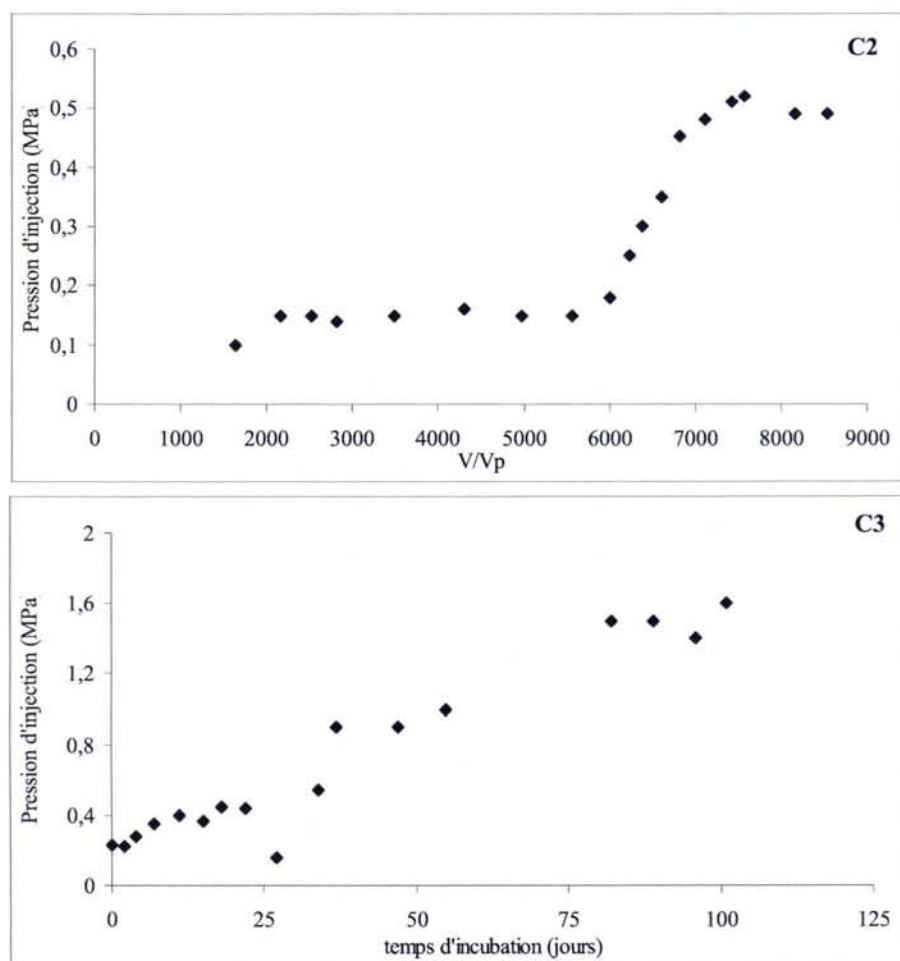


Figure 33. Evolution de la pression d'injection en fonction du volume d'alimentation dans les colonnes C2 et C3. I_{NAH1} : inoculation de la colonne par NAH1.

En condition abiotique, la pression d'injection était stable autour de 0,15 MPa. Suite à l'injection de NAH1, une augmentation de la pression a été observée. Au cours de la période de colonisation bactérienne (15 jours après l'injection), la pression est passée de 0,15 à 0,3 MPa. Par la suite, la croissance bactérienne a conduit à une augmentation de la pression d'injection jusqu'à 0,5 MPa. La stabilisation de la pression observée après 100 jours d'incubation correspond à celle observée (Figure 30) au niveau de la concentration en PHE en sortie de colonne. Dans le cas de la colonne C3, l'augmentation de la pression est continue tout au long de l'expérimentation et a atteint 1,6 MPa après 100 jours d'expérience. Les

conditions de croissance différentes des bactéries et la durée de l'expérience entre les colonnes C2 et C3 pourraient expliquer les résultats obtenus. Les aquifères contaminés traités grâce à une BPR, correspondent à des aquifères de surface à 10 ou 20 mètres du niveau du sol. Or, le gradient hydraulique dans ces aquifères est au maximum équivalent à 10 ou 20 mètres de hauteur d'eau. Ceci correspond à 1 ou 2 atmosphères soit environ 0,1 à 0,2 MPa. En condition naturelle, l'augmentation de pression liée à la croissance des bactéries pourrait donc conduire au colmatage de la colonne. Cependant le charbon actif utilisé avait une granulométrie relativement fine par rapport aux matériaux classiquement utilisés dans une BPR. Avec une granulométrie plus importante, l'évolution de la pression n'aurait sans doute pas été la même.

Parallèlement au bilan réalisé pour le PHE, la répartition des bactéries adsorbées dans les sections S1, S2 et S3 a été mesurée lors de l'arrêt des colonnes (Tableau 16). Les résultats montrent un gradient du nombre de bactéries adsorbées qui diminue entre les trois sections échantillonnées. La croissance bactérienne semble corrélée à la présence de phénanthrène, ce qui est sans doute lié au fait que PHE est la seule source de carbone du système. Les concentrations de bactéries adsorbées sont bien plus importantes que celles observées au chapitre (3.3). La croissance des bactéries au sein de la colonne semble corrélée au temps d'incubation. La comparaison des colonnes C2 et C3 montre que dans la section S2 de la colonne C3, la croissance bactérienne a été plus importante que dans la colonne C2. Des observations en microscopie confocale réalisées avec la colonne C3 (Figure 34) montrent que le taux de recouvrement du CA par les bactéries varie entre les 3 sections. De plus au niveau de S1, la présence d'un biofilm bactérien a pu être observé.

	Bactéries adsorbées (bactéries / g de CA)		
	C2 (NAH1)	C3 (NAH1)	C4 (MATE10)
S1	5,19E+09	2,19E+10	3,19E+09
S2	3,88E+09	6,88E+09	1,88E+09
S3	9,38E+07	2,38E+08	2,38E+07

Tableau 16. Nombre de bactéries adsorbées dans les sections S1, S2 et S3, pour les trois colonnes inoculées, en fin d'expérimentation.

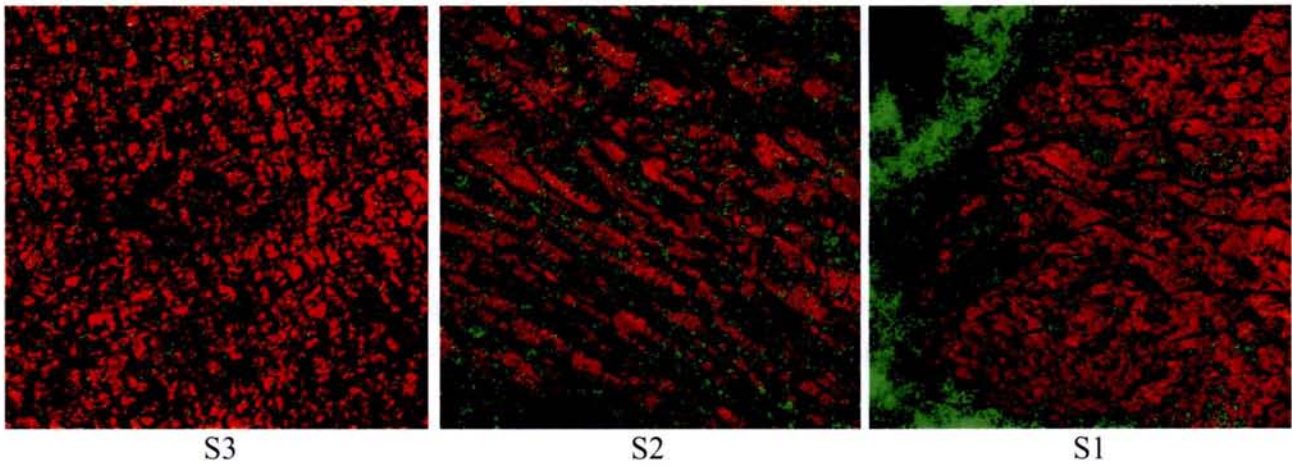


Figure 34. Observations de la répartition des bactéries (en vert) sur le charbon actif (en rouge) par microscopie confocale réalisées en fin d'expérience pour la colonne C3.

3.5.4 Conclusion du chapitre

Les mécanismes de biodégradation du PHE adsorbé sur CA observés lors des essais en batch (voir chapitre 3.3) semblent se confirmer lors des essais en colonne. Les souches NAH1 et MATE10 ont été capables de minéraliser le phénanthrène dans un système dynamique. L'inoculation initiale de la colonne retarde le temps de sortie du phénanthrène d'au moins 30 % et permet la dégradation du PHE adsorbé.

Ces essais en colonne ont montré l'efficacité du charbon actif dans sa capacité à adsorber le phénanthrène dans un système dynamique. En condition abiotique, le temps de rétention est d'environ 70 jours et la concentration finale en sortie de colonne atteint environ $600 \mu\text{g.L}^{-1}$. Ces résultats ne correspondent pas aux prévisions réalisées grâce au code de calcul Impact qui avait estimé un temps de rétention de l'ordre d'une dizaine de jour. Ceci montre que l'extrapolation des résultats obtenus en réacteurs fermés sous-estime l'efficacité du charbon actif. L'ajout d'un inoculum bactérien modifie les capacités de rétention de la colonne :

- ↳ Apporté après la saturation de la colonne en PHE, il diminue la concentration en PHE en sortie de colonne de moitié et permet la biodégradation de près de 80 % du PHE initialement adsorbé sur le CA.
- ↳ Initialement présent dans la colonne, il augmente la période pendant laquelle la concentration en PHE en sortie de colonne est faible ($< 30 \mu\text{g.L}^{-1}$).

La présence de bactéries dégradant le PHE semble donc avoir un impact favorable sur les mécanismes de rétention et de biodégradation du PHE dans un système dynamique. Cependant, la croissance des bactéries au sein de la colonne diminue sa perméabilité. Or l'efficacité du traitement nécessite de maintenir le flux d'eau qui ne doit pas être entravé. La production de biopolymères par NAH1 se traduit par une pression d'écoulement plus importante que celle pouvant se mesurer sur le terrain. Les risques de colmatage ne sont donc pas négligeables. La poursuite des essais en colonnes devrait permettre de vérifier si les mêmes résultats auraient été obtenus avec une souche ne produisant pas de biofilm (MATE10) et si l'utilisation d'un CA avec une granulométrie plus importante pourrait limiter l'augmentation de la pression d'écoulement.

***Discussion générale
et perspectives***

4 Discussion générale et perspectives

Le nombre croissant de sites contaminés par des hydrocarbures constitue un risque important pour l'environnement. Le développement de méthodes de traitement *in situ* des eaux souterraines contaminées doit permettre de limiter l'extension de ces pollutions (Scherer *et al.* 2000). L'intérêt pour les Barrières Perméables Réactives est croissant depuis le début des années 80. En effet, il s'agit d'une technique de traitement *in situ* qui présente de nombreux avantages techniques et financiers par rapport à d'autres méthodes de remédiation (pompage, stockage et traitement de l'effluent) (EPA 1998). Cette étude s'est inscrite dans le développement de cette méthode de traitement pour une contamination par des HAP. Ce travail constitue une approche des mécanismes et des interactions entre polluant – bactéries – matériaux réactifs qui se déroulent dans une BPR et peuvent en conditionner le fonctionnement. Au cours de cette étude, les mécanismes de sorption d'un HAP, le phénanthrène, sur différents matériaux ont été testés, ainsi que l'adsorption de bactéries dégradant les HAP sur un matériau sélectionné. Les conséquences de ces mécanismes de sorption et des propriétés des bactéries sur la biodégradation du phénanthrène en présence ou en absence de matériaux ont également été étudiées.

Parmi les trois matériaux présélectionnés, le charbon actif a présenté la capacité d'adsorption du phénanthrène la plus importante. De plus, des essais de biodégradation du phénanthrène en présence de charbon actif ont montré une augmentation du taux de minéralisation par rapport à des essais en absence de matériaux. Les caractéristiques physiologiques des bactéries dégradantes, en particulier la production de biopolymères, jouent un rôle important dans les phénomènes de minéralisation du phénanthrène. Parmi les souches testées au cours de cette étude, celles ayant la capacité de produire des biopolymères ont montré une aptitude à dégrader plus rapidement le phénanthrène en présence de charbon actif dans des réacteurs fermés. Ceci peut être mis en relation avec leur capacité à former des biofilms ainsi qu'à leur aptitude à s'adsorber préférentiellement sur un charbon actif recouvert de phénanthrène. Dans un système dynamique, l'inoculation de la colonne par une bactérie dégradante a augmenté son efficacité en retardant la sortie du phénanthrène et en favorisant sa dégradation au sein de la colonne. Les résultats obtenus au laboratoire permettent d'apporter des éléments dans la compréhension des interactions bactéries – HAP – matériaux en vue du développement d'une BPR dans le cadre d'une pollution par des HAP, en particulier au

niveau du choix du matériau réactif, des mécanismes de biodégradation du phénanthrène, des caractéristiques des bactéries dégradantes et du développement des essais en colonne.

4.1 Choix du matériau réactif

Au cours de l'étude préliminaire de faisabilité d'une BPR, le choix du matériau réactif constitue la première étape. Trois matériaux avaient été présélectionnés au début de cette étude : la pouzzolane recouverte ou non de fioul lourd et le charbon actif. Le choix de ces matériaux a été fait par rapport à deux critères : tout d'abord leur perméabilité en choisissant des matériaux avec une granulométrie supérieure à 1 mm et leur utilisation dans des méthodes de traitement au sein de BPR pour le charbon actif (EPA 1998) ou dans le cadre d'autres types de traitement (Menoret 2001). Les résultats des isothermes d'adsorption du phénanthrène (Figure 13) ont montré que le charbon actif présente la capacité d'adsorption la plus importante et que les phénomènes de désorption semblent limités pour ce matériau. Ceci pourrait être dû à sa très grande surface spécifique (Tableau 8). La faible surface spécifique de la pouzzolane limite sa capacité d'adsorption. Le recouvrement de la pouzzolane par un composé organique lourd, augmente d'un facteur 200 sa capacité d'adsorption du phénanthrène. Un des objectifs de cette étude était de coupler des mécanismes d'adsorption du polluant avec des phénomènes de biodégradation. Des essais de minéralisation du phénanthrène en présence des trois matériaux ont montré que l'adsorption du phénanthrène sur les matériaux ne limitait pas les mécanismes de dégradation et au contraire l'augmentait dans le cas du charbon actif et de la pouzzolane non recouverte par un fioul lourd. En présence de PzF, le taux de PHE minéralisé était moins important par rapport au traitement sans matériau. Le couplage des deux mécanismes, en présence de charbon actif ou de pouzzolane non recouverte, semblait donc possible.

La modélisation des résultats des isothermes d'adsorption par le modèle de Freundlich permet de comparer les résultats obtenus pour les trois matériaux (Simon et Meggyes 2000). Cependant, les phénomènes de désorption limités observés dans le cas du charbon actif et de la pouzzolane recouverte par du fioul lourd ne correspondent pas à un modèle de type Freundlich qui relie la concentration en solution à l'équilibre avec la quantité de phénanthrène adsorbé. L'utilisation d'autres modèles de type Langmuir et Freundlich avec deux types de sites d'adsorption pourrait permettre de prendre en compte les résultats obtenus lors des essais de désorption. La granulométrie du charbon actif utilisé a été choisie par rapport aux

dimensions des colonnes utilisées et correspond à la limite inférieure par rapport aux matériaux utilisés classiquement dans une BPR (Annette Esnault-Filet, société Solétanche Bachy, communication personnelle). Il serait toutefois intéressant de faire des essais, notamment en colonne, avec des charbons actifs de granulométrie plus importante pour tester l'effet de ce paramètre sur l'adsorption et la dégradation du polluant.

4.2 Effet des souches bactériennes sur la biodégradation du phénanthrène

Les cinq souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été isolées à partir d'un sol contaminé par des HAP. Les essais de biodégradation du phénanthrène en absence ou en présence de charbon actif ont montré que l'efficacité de minéralisation des différentes souches n'était pas la même. En absence de charbon actif le classement des souches suivant leur capacité à dégrader le phénanthrène est par ordre décroissant: MATE10 – MATE3 > MATE12 – MATE7 > NAH1. Dans le cas des traitements avec charbon actif, le classement est modifié et devient : MATE7 – MATE3 > MATE10 – NAH1 – MATE12. La présence d'un support a un effet positif sur la dégradation du phénanthrène pour les souches NAH1, MATE3 et MATE7 (Figure 22). Ceci peut être relié à leur capacité à produire des biopolymères et à s'adsorber de manière plus importante sur du charbon actif recouvert par du fioul lourd (Figure 16). Pour la souche MATE12, la cinétique de dégradation du phénanthrène est équivalente en présence ou en absence de charbon actif. Or plus de 90% du phénanthrène a été adsorbé sur le charbon actif, il semble donc que sa vitesse de dégradation soit inférieure ou égale à la vitesse de désorption du phénanthrène. Dans le cas de la souche MATE10, la présence de charbon actif a un effet négatif sur la minéralisation du phénanthrène. Il semble donc, ici, que la cinétique de désorption constitue un facteur limitant pour cette souche.

Les différences observées montrent que les phénomènes de biodégradation peuvent être considérés comme des phénomènes dynamiques, dépendant de la vitesse de transfert du substrat et de la capacité catabolique de la souche bactérienne considérée. Le rapport entre la vitesse de transfert et la capacité catabolique permet de déterminer un facteur de biodisponibilité (B_n) qui donne une mesure de la dégradation effective d'un substrat dans un environnement donné (Bosma *et al.* 1997). Pour un rapport supérieur à 1, le taux de biodégradation est contrôlé par l'activité métabolique des microorganismes (activité spécifique et densité de la population). Les souches NAH1, MATE3 et MATE7 semblent être dans ce cas. Lorsque B_n est égal à 1, le taux de biodégradation est contrôlé à la fois par le

taux de transfert, dans notre étude le taux de désorption, et l'activité métabolique des bactéries. Ceci semble correspondre aux résultats observés pour la souche MATE12. Enfin lorsque B_n est inférieur à 1, le taux de biodégradation est limité par un taux de transfert insuffisant ou par une augmentation trop importante de la population microbienne. Dans le cas de la souche MATE10, il semble que le taux de désorption du phénanthrène ne soit pas suffisant par rapport à l'efficacité catabolique de la souche. Cependant, le suivi de la population bactérienne n'ayant pas été réalisé, il n'est pas possible de conclure avec certitude par rapport au phénomène limitant la dégradation du phénanthrène par MATE10 en présence de charbon actif qui pourrait également être attribué à une croissance bactérienne trop importante par rapport à la disponibilité du substrat carboné. A partir des résultats obtenus en absence de CA, il est possible de déterminer le taux de dégradation intrinsèque de chaque souche bactérienne. Les essais de désorption de PHE n'ont pas permis de quantifier directement le transfert du phénanthrène. En effet, ces essais ont été réalisés sur une période de 48 heures qui ne correspond pas au temps d'incubation lors des essais en batch ou en colonne. La réalisation d'essais de désorption sur une période plus longue permettrait d'optimiser la quantification du transfert de PHE. De plus, ces essais permettraient de voir si des mécanismes de désorption lente ne seraient pas masqués par la variabilité liée à la mesure. Des essais de solubilisation du phénanthrène adsorbé en présence de surfactant ou de composés organiques présents dans les biofilms, pourraient permettre de quantifier une désorption supplémentaire liée à des composés organiques d'origine biologique.

La capacité des souches bactériennes à dégrader le phénanthrène adsorbé semble donc principalement conditionnée par les mécanismes de diffusion du phénanthrène (désorption et transfert). Johnsen *et al.* (2005) analysent ce phénomène par rapport aux mécanismes mis en œuvre par les microorganismes pour optimiser la diffusion des HAP. En considérant que la diffusion peut être formalisée par la première loi de diffusion de Fick, il est possible de distinguer différents facteurs qui interviennent dans la diffusion du phénanthrène :

$$Q / t = - D * A * (C_0 - C_x) / x$$

Ici Q est la quantité de substrat en mole diffusant à partir d'une surface A (m^2) en fonction du temps t (s). D correspond au coefficient de diffusion ($m^2.s^{-1}$). $(C_0 - C_x) / x$ correspond au gradient de concentration entre le phénanthrène adsorbé (C_0 en $mol.m^{-3}$) et le microorganisme (C_x $mol.m^{-3}$) localisé à une distance x (m) du charbon actif. Le schéma de ce mécanisme est présenté dans la Figure 35.

Le flux de phénanthrène peut être augmenté en accentuant le coefficient de diffusion D . La production de biopolymères ou de biosurfactants permet d'augmenter la solubilité et la diffusion des HAP (Boochan *et al.* 1998, Van Dyke *et al.* 1993b) et ainsi d'accentuer leur disponibilité. La capacité des souches NAH1, MATE3 et MATE7 à produire des biofilms permet d'augmenter la surface de contact (A) bactéries / phénanthrène favorisant le transfert du substrat. Par rapport à l'équation précédente, l'adhésion des microorganismes sur le charbon actif permet de réduire le paramètre x ce qui tend à augmenter la quantité de substrat diffusant à partir du charbon actif. Il faut souligner que parmi les 5 souches bactériennes utilisées, celles qui produisaient des biofilms, NAH1, MATE3 et MATE7, étaient également mobiles, alors que les souches MATE10 et MATE12 ne le sont pas. Cette capacité pourrait intervenir au niveau de la diffusion du phénanthrène en réduisant la distance entre les microorganismes et le substrat. L'utilisation de mutants non mobiles et/ou non producteurs de biofilms permettrait de préciser le rôle de ces caractères bactériens vis-à-vis de l'adsorption et de la biodégradation.

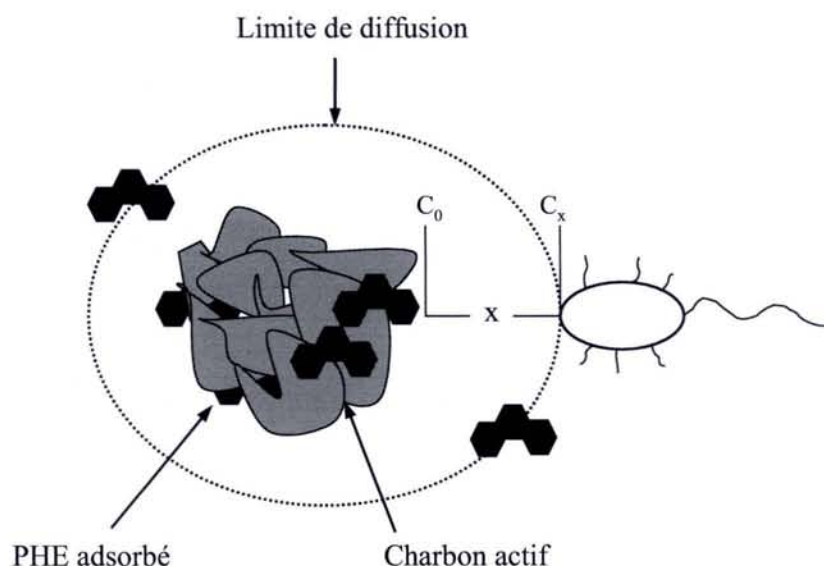


Figure 35. Schéma de transfert du phénanthrène à partir du charbon actif. C_0 concentration en phénanthrène à la surface du charbon actif, C_x concentration en phénanthrène au niveau du microorganisme, x distance charbon actif – microorganisme (d'après Johnsen *et al.* 2005).

Afin de compléter ces travaux et de prédire le devenir du phénanthrène fixé sur CA, l'utilisation d'autres souches bactériennes permettrait d'apporter des éléments complémentaires. En effet, la souche MATE10 est la plus efficace en terme de dégradation en absence de charbon actif. Cependant en présence de charbon actif et en batch, son efficacité est limitée par la cinétique de désorption du phénanthrène. L'addition de biosurfactant ou la

co-inoculation de MATE10 avec une souche non dégradante mais produisant des biosurfactants, permettrait de vérifier cette hypothèse. (Providenti et al. 1995a) ont réalisé des expériences similaires avec deux souches bactériennes, *Pseudomonas aeruginosa* UG2, capable de produire des biosurfactants, et *Pseudomonas sp.* UG14r, capable de dégrader les HAP. La dégradation du phénanthrène a été plus importante lors des essais en co-culture, alors qu'en présence de la souche UG14r et de biosurfactant une inhibition (10 à 15%) de la biodégradation a été observée. Par ailleurs, l'utilisation de consortiums bactériens isolés à partir de sols contaminés ou non au lieu de souches pures lors d'essai de biodégradation permettrait de suivre le devenir du phénanthrène en milieu microbien complexe et de se rapprocher des conditions *in situ*, en particulier au niveau d'éventuels mécanismes de synergie et/ou de compétition entre les souches bactériennes.

Au niveau d'un sol ou au sein d'un aquifère contaminé, la microflore bactérienne doit être adaptée à de nombreuses sources de carbone et les HAP ne sont pas la seule source de carbone présente. Cette composante multisource, peut induire une compétition par rapport aux mécanismes de dégradation des HAP (Corgié *et al.* 2004, Lee *et al.* 2003). Elle peut aussi induire des phénomènes de co-métabolisme et favoriser la dégradation de HAP plus lourds. Des essais de dégradation en présence de sources complémentaires de carbone permettraient d'étudier ces phénomènes. Enfin la biodégradation des HAP n'aboutit pas obligatoirement à la production de CO₂. En effet, certaines voies de dégradation conduisent à l'accumulation de métabolites qui peuvent être utilisés par des souches bactériennes non dégradantes. La caractérisation des métabolites pourrait permettre de déterminer des traceurs de la biodégradation spécifique d'une souche ou d'une communauté microbienne. De plus, il serait nécessaire de préciser la toxicité de ces métabolites qui peuvent être plus toxiques que la molécule mère (Belkin *et al.* 1994, Gram 1995).

4.3 Caractérisation des propriétés de surface et formation d'un biofilm

La capacité des souches NAH1, MATE3 et MATE7 à produire des biopolymères favorise leur adhésion sur le charbon actif lorsque celui-ci est recouvert de PHE (Figure 16). Ces molécules de surface actives (Surface-Active Compounds, Neu 1996) semblent intervenir dans les mécanismes d'interactions bactéries – charbon. Le classement de ces molécules peut se faire en fonction de leur taille et de la proportion de régions hydrophobes (Neu 1996) :

- ↳ Biosurfactant : molécule de faible poids moléculaire ayant des propriétés surfactantes (présent aux interfaces, réduction de la tension superficielle, formation de micelle) (ex : glycolipides, peptidolipides)
- ↳ Biopolymère amphiphile : molécule de poids moléculaire élevé présente à la surface des bactéries ou excrétée avec une région hydrophobe à une de ses extrémités (ex : lipopolysaccharide, lipoglycane)
- ↳ Biopolymère polyphilique : molécule de poids moléculaire élevé présente à la surface des bactéries ou excrétée avec plusieurs régions hydrophobes réparties sur toute sa structure (émulsifiant)

Dans ce travail, la production de biopolymères ou biofilms a été observée, mais ceux-ci n'ont pas été caractérisés et leur nature chimique n'a pas pu être identifiée. La caractérisation de ces composés de surface pourrait permettre d'expliquer les différences observées au niveau des propriétés de membrane. D'autre part, l'analyse des images obtenues en microscopie confocale par un logiciel de reconstruction en 3D permettrait aussi de quantifier et préciser la formation et l'évolution au cours du temps de sa structure.

L'utilisation du test MATH a permis d'étudier l'affinité des cinq souches bactériennes vis-à-vis d'une surface hydrophobe. Cependant, contrairement à la réalisation d'une isotherme d'adsorption, cette mesure n'a été effectuée que sur un nombre limité de rapports volume de phase aqueuse / volume de phase organique. Le résultat obtenu correspond donc plus à un coefficient de partage. De plus, la réalisation de l'émulsion qui permet la mise en contact des deux phases, en particulier la taille des gouttes de solvant, est très dépendante des conditions expérimentales : temps d'agitation, énergie appliquée, dimensions de la verrerie. Enfin, lors des essais avec le toluène, sa solubilité dans l'eau n'a pas été prise en compte. Or la présence de toluène en solution dans l'eau pourrait modifier les mécanismes d'adhésion des bactéries à

l'interface toluène – eau. En complément du test MATH, d'autres méthodes pourraient être utilisées comme la mesure des angles de contact avec l'eau, qui permettrait de quantifier de manière plus juste l'hydrophobicité des bactéries et du CA.

Les résultats de caractérisation des propriétés acido-basiques des membranes bactériennes grâce au titrage potentiométrique acido-basique ne semblent pas corrélés aux résultats obtenus au niveau des isothermes d'adsorption des bactéries sur le charbon actif. Les conditions expérimentales du titrage peuvent influencer de manière importante les résultats obtenus. Le conditionnement des biomasses en milieu acide permet de limiter les perturbations dues à la présence de cations comme le calcium (Briones-Gallardo 2002). Cependant, cette étape de préparation pourrait modifier la structure et la composition des membranes bactériennes par exemple par hydrolyse acide des molécules présentes à la surface de la membrane bactérienne. La réalisation de spectres d'absorption des infra-rouges pourrait permettre de caractériser l'impact du conditionnement sur les groupements chimiques comportant des liaisons C=O, C-H, O-H. De plus, les titrages potentiométriques ont été réalisés avec des biomasses au stade de croissance exponentielle, en culture dans un milieu non sélectif. Cependant, les conditions et stade de culture peuvent modifier l'expression de certaines protéines membranaires ce qui pourrait influencer les propriétés acido-basiques des bactéries (Hass 2004). Dans cette optique, la réalisation d'un titrage potentiométrique sur des biomasses ayant été cultivées dans un milieu sélectif avec du phénanthrène comme seule source de carbone permettrait d'étudier les modifications des propriétés acido-basiques des membranes induites par la culture dans un milieu sélectif et par le stade de croissance.

Les essais d'adsorption des bactéries sur le charbon actif ont été réalisés sur un temps très court (1 heure). Au cours de cette courte période, seules les premières étapes de formation d'un biofilm doivent avoir eu lieu. Durant les premières étapes de formation d'un biofilm sur une surface solide, des phénomènes d'adsorption d'une couche de composés organiques ont été observés (Bruinsma *et al.* 2001) avec une cinétique plus rapide que l'adsorption des bactéries. Ceci correspond à une étape de conditionnement de la surface. Ce conditionnement peut également permettre à des bactéries hydrophiles d'adhérer sur des surfaces hydrophobes en déposant un film de biopolymères (SAC) qui leur permet de s'adsorber par la suite (Neu 1996). Le mécanisme opposé (bactéries hydrophobes – surface hydrophile) est également possible. Au cours des essais de biodégradation de PHE par NAH1, MATE3 et MATE7, la formation d'un biofilm n'apparaît pas dans les premiers jours de

l'incubation mais un conditionnement de la surface pourrait se produire durant cette période et modifier les interactions avec CA. Ce mode de croissance pour les trois souches concernées pourrait constituer une réponse adaptative par rapport à une diminution de la disponibilité du substrat en présence d'une phase solide sur laquelle il s'adsorbe. En effet, la formation d'un biofilm constitue une réponse aux contraintes environnementales (Jefferson 2004) : réponse à un stress, maintien dans une zone favorable. Lors des essais en colonne, le développement d'un biofilm a modifié les conditions hydrodynamiques du système en réduisant sa perméabilité.

4.4 Essais à différentes échelles et perspectives

Les essais en colonne ont montré l'efficacité du charbon actif dans sa capacité à retenir le phénanthrène. L'extrapolation des résultats obtenus en batch en utilisant un modèle de Freundlich a sous-estimé de manière importante le temps de sortie du phénanthrène. Il conviendrait donc de tester et d'utiliser d'autres modèles pour rendre compte à la fois des observations en batch et en colonnes (modèle de type Langmuir). De plus, le passage des essais en batch à des essais colonnes a montré l'impact du changement d'échelle sur les résultats qui pouvaient être obtenus. Dans cette optique, il serait intéressant de réaliser des essais pilotes avec des colonnes ou des dispositifs de plus grandes dimensions, ce qui permettrait de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation dans une BPR.

Au niveau des perspectives de travail, le prolongement des essais en colonne permettrait d'apporter des informations complémentaires sur les interactions HAP – bactéries – charbon actif. Tout d'abord, il serait intéressant de travailler avec d'autres HAP ou avec des composés organiques (BTEX) en mélange avec le PHE afin d'étudier les mécanismes de compétition vis-à-vis de l'adsorption sur le charbon actif en suivant un mélange de molécules. L'utilisation d'éléments marqués au ^{14}C pourrait permettre de suivre cette compétition entre HAP (Millette *et al.* 1998). De plus dans cette étude, la complexité de la composition chimique de la solution du constituant l'aquifère dans un système naturel n'a pas été prise en compte. En effet, la présence de matière organique sous forme colloïdale ou dissoute peut constituer une phase porteuse qui peut modifier le temps de sortie du ou des polluants testés (Magee *et al.* 1991). De plus, la présence de particules fines dans la solution peut être à l'origine de phénomènes de colmatage qui n'ont pas été abordés lors des essais en colonne. Il conviendrait de préciser les mécanismes de co-métabolisme qui pourraient avoir lieu en

présence de plusieurs HAP en mélange, en particulier des HAP avec plus de 4 cycles aromatiques, dans la solution d'alimentation. La production de métabolites et leur présence en sortie de colonne devraient être pris en compte. En effet, les métabolites sont beaucoup plus solubles que les HAP, leur rétention dans la BPR est donc sans doute plus faible ce qui entraîne un risque de dispersion en aval de la BPR. Les métabolites sont intrinsèquement plus dégradables que les HAP en particulier par des bactéries qui ne peuvent pas utiliser les HAP comme seule source de carbone. Cependant, une croissance bactérienne importante en aval de la BPR pourrait aussi perturber les caractéristiques hydrodynamiques de l'aquifère.

L'inoculation de la colonne par NAH1 s'est traduite par une diminution de la concentration en PHE en sortie de colonne et par une dégradation de PHE adsorbé. Les essais prévus avec la souche MATE10 n'ont pas pu être réalisés. Les résultats de la colonne C4, inoculée avec MATE10, ont montré comme avec NAH1 un temps de latence avant d'observer une diminution de la concentration de PHE en sortie de colonne. Cependant, le bilan réalisé montrait une dégradation de PHE adsorbé de l'ordre de 20 % en moins de 15 jours. La poursuite des essais en colonne sur une période plus longue permettrait de voir si les propriétés différentes de cette souche (efficacité de dégradation plus importante, absence de production de biopolymères) modifieraient le devenir de PHE dans la colonne, en particulier l'augmentation de la pression observée avec NAH1. La biodégradation du PHE entraîne une consommation d'oxygène utilisée comme accepteur final d'électron. Lors des essais réalisés, dans ce travail, ce paramètre n'a pas été pris en compte en raison des conditions opératoires qui ne conduisaient pas à une limitation de la concentration en oxygène dissout. Cependant, cette concentration peut constituer un facteur limitant en conditions réelles (présence d'autres substrats carbonés, densité bactérienne importante). Dans cette optique, l'impact de l'apport de composés libérant de l'oxygène au contact de l'eau (ORC, Oxygène Releasing Compounds (Cassidy et Irvine 1999) sur la biodégradation des HAP serait à préciser.

La combinaison d'une approche physico-chimique de fixation des polluants sur le charbon actif avec une approche biologique de biodégradation dans une BPR n'implique pas nécessairement une inoculation préalable de la colonne. En effet, celle-ci représenterait un coût supplémentaire et ne garantirait pas forcément une meilleure efficacité de la BPR. Le maintien de la microflore inoculée et sa compétitivité pour le substrat par rapport à la microflore indigène du sol ou de l'aquifère n'est pas facile à prédire. De plus, la présence de

prédateur (bactériophage, protozoaire) constitue une pression de sélection supplémentaire qui peut être en défaveur de la souche inoculée. Dans cette optique, il faudrait étudier dans des expériences en colonne, le maintien d'une souche (NAH1, MATE10 ou autres) bactérienne, initialement présente dans la colonne, en fonction de la présence d'un consortium bactérien dans la solution d'alimentation. Le suivi de la colonisation de la colonne par un consortium bactérien pourrait permettre de comprendre les mécanismes se déroulant sur le terrain lors de la mise en eau d'une BPR.

4.5 Conclusion

Au cours de cette étude, les résultats obtenus ont montré qu'il était possible au sein d'une BPR de combiner des mécanismes d'adsorption et de biodégradation des HAP. Parmi les trois matériaux testés, la charbon actif semble être le plus adapté aux contraintes liées à l'utilisation dans une BPR. Au niveau des interactions bactéries-HAP-CA, les propriétés physiologiques (catabolisme, propriétés des membranes) des microorganismes dégradants conditionnent leur capacité à métaboliser le PHE adsorbé sur CA. Cependant les essais de biodégradation en colonne ont montré que le développement de microorganismes pouvait induire un risque de colmatage du système.

Afin de pouvoir poursuivre cette étude, différents paramètres restent à étudier :

- ↳ La production de métabolites en précisant leur toxicité et de leur biodégradabilité
- ↳ La consommation en oxygène dont l'évolution de la concentration au sein d'une BPR peut constituer un facteur limitant dans les mécanismes de dégradation aérobie des HAP.
- ↳ L'évolution sur une période plus importante du devenir des HAP dans une BPR

Lors des expériences en colonnes, le système a dû être simplifié afin de pouvoir mieux étudier les interactions bactéries-CA-PHE. Afin d'exploiter les résultats en vue de valider l'utilisation d'une BPR pour le traitement d'une contamination par les HAP, il convient de s'assurer que les mécanismes observés dans cette étude ne seraient pas affectés par la complexification du système opérationnel (pollution complexe, communauté microbienne).

L'extrapolation des résultats obtenus en batch aux expériences en colonne a mis en évidence certaines contraintes liées au changement d'échelle. La réalisation d'expériences pilotes avec des systèmes de plus grande dimension permettrait de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation d'une BPR.

BIBLIOGRAPHIE

- Achouak W, Thomas F and Heulin T 1994 Physico-chemical surface properties of rhizobacteria and their adhesion to rice roots. *colloids and surface B : Biointerfaces* 3, 131-137.
- Ahimou F, Paquot M, Jacques P, Thonart P and Rouxhet P G 2001 Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 45, 119-126.
- Ahn Y, Sanseverino J and Sayler G S 1999 Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation* 10, 149-157.
- Alexander M 1994 *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, San Diego.
- Amellal N, Portal J M and Berthelin J 2001 Effect of soil structure on bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry* 16, 1611-1619.
- Andersson B E and Henrysson T 1996 Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of whit rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46, 647-652.
- Andreoni V, Cavalca L, Rao M H, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M and Gianfreda L 2004 Bacterial communities and enzyme activities of PAH polluted soil. *Chemosphere* 57, 401-412.
- Angove M J, Fernandes M B and Ikhsan J 2002 The sorption of anthracene onto goethite and kaolinite in the presence of some benzene carboxylic acids. *Journal of colloid and interface science* 247, 282-289.
- Bastiaens L, Springael D, Wattiau P, Harms H, De Wachter R, Verachtert H and Diels L 2000 Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1834-1843.
- Belkin S, Stieber M, Tiehm A, Frimmel F H, Abeliovich A, Werner P and Ulitzur S 1994 Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation. *Environmental Toxicology and Water Quality* 9, 303-309.
- Berthelin J, Dutartre P, Leyval C, Munier-lamy C, Ferard JF, Morel JL, Sinaj S, Block JC, Henry AL, 1996, *Réflexions sur la faisabilité de traitements biologiques de sols*

- pollués au cours d'activités industrielles, Document technique de l'Agence de l'eau Rhin-Meuse, 20513 RM, 71p.
- Binet P, Portal J M and Leyval C 2000 Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil biology and biochemistry* 32, 2011-2017.
- Bogan B W and Lamar R T 1995 One-electron oxidation in the degradation of creosote polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2631-2635.
- Boldrin B, Tiehm A and Fritzsche C 1993 Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1927-1930.
- Boochan S, Britz M L and Stanley G A 1998 Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnology and Bioengineering* 59, 482-494.
- Boonchan S, Britz M L and G.A. S 2000 Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1007-1019.
- Borden R, Goin R and Kao C 1997 Control of BTEX migration using a biologically enhanced permeable barrier. *Groundwater Monitoring and Remediation* winter 1997, 70-80.
- Bosma T N P, Middeldorp P J M, Schraa G and A.J.B. Z 1997 Mass tranfert limitation of biotransformation : quantifying bioavailability. *Environmental Science and Technology* 31, 248-252.
- Briones-Gallardo R 2002 caractérisation des propriétés de surface des champignons mycorrhiziens à arbuscules (MA) en relation avec l'adsorption du cadmium et du cuivre. *In Géosciences*. pp 191. Henri Poincaré Nancy I, Nancy.
- Bruinsma G M, van der Mei H C and Busscher H J 2001 Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22 (24) Special Iss. SI, 3217-3224.
- Busscher H J, van de Belt-Gritter B and van der Mei H C 1995 Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 1- Zeta potentiels of hydrocarbon droplets. *colloids and surface B : Biointerfaces* 5, 111-116.
- Cassidy D P and Irvine R L 1999 Use of calcium peroxide to provide oxygen for contaminant biodegradation in a saturated soil. *Journal of Hazardous Materials* B69, 25-39.

- Cathelain M, Friant G and Olie J L 1981 Les eaux de ruissellement de chaussées autoroutières : évaluation des charges de pollution. Bulletin de liaison des laboratoires des Ponts et Chaussées 116, 9-24.
- Chiou C T, MacGroddy S E and Kile D E 1998 Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments. Environmental Science and Technology 32, 264-269.
- Churchill S A, Harper J P and Churchill P F 1999 Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three and four ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. Applied and Environmental Microbiology 65, 549-552.
- Colin C 2000 pollution localisée des sols et des sous-sols par les hydrocarbures et par les solvants chlorés. Editions tec et doc, Paris. 417 p.
- Corgié S C, Beguiristain T and Leyval C 2004 Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. Applied and Environmental Microbiology in press.
- Cutright T J and Lee S 1994a Microorganisms and metabolic pathway for remediation of PAH contaminated soil. Fresenius Environmental Bulletin 3, 413-421.
- Cutright T J and Lee S 1994b Remediation of PAH-contaminated soil using *Achromobacter* sp. Energy Sources 16, 279-287.
- de Mesquita L M S, Lins F F and Torem M L 2003 Interaction of a hydrophobic bacterium strain in a hematite-quartz flotation system. International Journal of Mineral Processing 71, 31-44.
- Dean-Ross D, Moody J D, Freeman J P, Doerge D R and Cerniglia C E 2001 Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. FEMS Microbiology Letters 204, 205-211.
- Doong R A and Lei W G 2003 Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant. Journal of Hazardous Materials 96, 15-27.
- Dziurla M A, Achouak W, Lam B T, Heulin T and Berthelin J 1998 Enzyme-linked Immunofiltration assay to estimate attachment of thiobacilli to pyrite. Applied and Environmental Microbiology 64, 2937-2942.
- Eggen T and Majcherczyk A 1998 Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. International Biodeterioration and Biodegradation 41, 111-117.

- Eggen T and Sveum P 1999 Decontamination of aged creosote polluted soil : the influence of temperature, white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, and pretreatment. *International Biodeterioration and Biodegradation* 43, 125-133.
- EPA 1998 Permeable Reactive Barrier technologies for contaminant remediation. pp 94. United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Eriksson M, Dalhammar G and Mohn W W 2002 Bacterial growth and biofilm production on pyrene. *FEMS Microbiology Ecology* 40, 21-27.
- Friedrich M, Grosser R J, Kern E A, Inskeep W P and Ward D M 2000 Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation : Molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2703-2710.
- Fu G, Kan A T and Tomson M 1994 Adsorption and desorption hysteresis of PAHs in surface sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1559-1567.
- Gaboriau H and Saada A 2001 Influence of heavy organic pollutants of anthropic origin on PAH retention by kaolinite. *Chemosphere* 44, 1633-1639.
- Garcia Junco M, Gomez Lahoz C, Niqui Arroyo J L and Ortega Calvo J J 2003 Biosurfactant- and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. *Environmental Science and Technology* 37, 2988-2996.
- Gram T E 1995 Metabolic activation and toxicity of some chemical agents to lung tissue and cells. *Biochemical pharmacology* 49, 1721-1727.
- Grosser R J, Friedrich M. W, D.M. and Inskeep W P 2000 Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation : different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2695-2702.
- Guellil A, Block J C and Urbain V 1998 Adaptation of the microbial adhesion to hydrocarbon test (MATH) for measuring activated sludge hydrophobicity. *Water Science and Technology* 37, 359-362.
- Haeseler F, Blanchet D, Druelle V, Werner P and JP V 1998 Degradation of PAH : pollutant accessibility and efficiency of soil microflora. *contaminated soil*, 791-792.
- Harms H and Zehnder A J B 1994 Influence of substrate diffusion on degradation of dibenzofuran and 3-chlorodibenzofuran by attached and suspended bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2736-2745.
- Hass J R 2004 Effects of cultivation conditions on acid-base titration properties of *Shewanella putrefaciens*. *Chemical Geology* 209, 67-81.

- Hassink J, Bouwman L A, Zwart K B and Brussaard L 1993 Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 47-55.
- Hatzinger P B and Alexander M 1995 Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology* 29, 537-545.
- Huang W and Weber J W J 1997 A distributed reactivity model for sorption by soil and sediments : 10. Relationship between desorption, hysteresis and the chemical characteristics of organic domains. *Environment Science and Technology* 31, 2562-2569.
- Huysman F and Verstraete W 1993 Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns ; influence of inoculation and irrigation methods. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 91-97.
- Hwang S and Cutright T J 2002 Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere* 47, 891-899.
- Jayr E 2001 Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en milieu crayeux : sorption et biodégradation. *In Science et Technique du déchet*. pp 194. Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon.
- Jefferson K K 2004 What drives bacteria to produce a biofilm. *Fems Microbiology Letters* 236, 163-173.
- Jenkins M B and Lion L W 1993 Mobile bacteria and transport of polynuclear aromatic hydrocarbons in porous media. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3306-3313.
- Johnsen A R, Wick L Y and Harms H 2005 Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* 133, 71-84.
- Johnson C R and Scow K M 1999 Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation* 10, 43-50.
- Juhasz A L, Britz M L and Stanley G A 1997 Degradation of benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracene and coronene by *Burkholderia cepacia*. *Water Science and Technology* 36, 45-51.
- Juhasz A L, Stanley G A and Britz M L 2000 Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology* 30, 396-401.

- Kaal E E J, De Jong E and Field J A 1993 Stimulation of ligninolytic peroxidase activity by nitrogen nutrients in the white rot fungus *Bjerkandera sp.* Strain BOS55. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 4031-4036.
- Kästner M and Mahro B 1996 Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by organic matrix of compost. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, 668-675.
- Kazunga C and Aitken M D 2000 Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1917-1922.
- Khan A A, Wang R F, Cao W W, Doerge D R, Wennerstrom D and Cerniglia C E 2001 Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *mycobacterium sp.* strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3577-3585.
- Kozlova E V, Puntus I F, Slepkin A V and Boronin A M 2004 Naphtalene degradation by *Pseudomonas putida* strains in soil model systems with arsenite. *Process Biochemistry* 39, 1305-1308.
- Krivobok S, Miriouchkine E, Seigle-Murandi F and Benoit-guyod J L 1998 Biodegradation of anthracene by soil fungi. *Chemosphere* 37, 523-530.
- Laha S and Luthy R G 1991 Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environmental Science and Technology* 25, 1920-1930.
- Laor Y, Strom P F and Farmer W J 1996 The effect of sorption on phenanthrene bioavailability. *Journal of Biotechnology* 51, 227-234.
- Leduc R, Samson R, Al-Bashir B, Al-Hawari J and Cseh T 1992 Biotic and abiotic disappearance of four HAP compounds from flooded soil under various redox conditions. *Water Science and Technology* 26, 51-60.
- Lee K, Park J W and Ahn I S 2003 Effect of additional carbon source on naphtalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. *Journal of Hazardous Materials* 105, 157-167.
- Leyval C, Portal J M, Criquet S, Amellal N, Berthelin J, Barriuso E, Bergheud V, Chenu C and Pétraud J P 2001 Localisation des HAP et des microfiores dans les sols : Conséquences sur la mobilité et la biodisponibilité. pp 94. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Nancy.

- Li Z and Bowman R 1998 Sorption of perchloroethylene by surfactant-modified zeolite as controlled by surfactant loading. *Environmental Science and Technology* 32, 2278-2282.
- Liebeg E W and Cutright T J 1999 The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* 44, 55-64.
- Magee B R, Lion L W and Lemley A T 1991 Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media. *Environmental Science and Technology* 25, 323-331.
- Mahjoub B 1999 Comportement dans le sol de polluants aromatiques issus du goudron de houille. Etude du partage goudron/eau et de l'effet du vieillissement sur la mobilité des polluants. *In* INSA de Lyon. pp 262. INSA, Lyon.
- Marschner B, Baschien C, Sarnes M and Döring U 1999 Effect of pH, electrolytes and microbial activity on the mobilization of PCB and PAH in a sandy soil. *In* Effects of mineral-organic-microorganism interactions on soil and freshwater environments, Eds J Berthelin, P M Huang, J M Bollag and F Andreux. pp 227-236. Kluwer academic, New York.
- McNally D L, Mihelcic J R and Lueking D R 1999 Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere* 38, 1313-1321.
- Méline F 1995 Interactions à l'interface Thiobacillus Ferrooxidans / Pyrite : inhibition et adhesion. *In* Géomicrobiologie. pp 200. Université Henri Poincaré, Nancy.
- Menn F M, Applegate B M and Sayler G S 1993 NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1938-1942.
- Menoret C 2001 Traitement d'effluent concentrés par culture fixées sur gravier ou pouzzolane. *In* Science de l'eau et de l'environnement continental. pp 124. Université Montpellier II, Montpellier.
- Meulenbergh R, Rijnaarts H H M, Doddema H J and Field J A 1997 Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters* 152, 45-49.
- Millette D, Butler B J, Frind E O, Comeau Y and Samon R 1998 Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds in columns of sandy aquifer material. *Journal of contaminant hydrology* 29, 165-183.

- Moller S, Pedersen A R, Poulsen L K, Arvin E and Molin S 1996 Activity and three-dimensional distribution of toluene degrading *Pseudomonas putida* in a multispecies biofilm assessed by quantitative *in situ* hybridization and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 4632-4640.
- Moody J D, Freeman J P, Doerge D R and Cerniglia C E 2001 Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspension of *mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1476-1483.
- Moreno-Castilla C, Bautista-Toledo I, M.A. F-G and Rivera-Utrilla J 2003 Influence of support surface properties on activity of bacteria immobilised on activated carbon for water denitrification. *Carbon* 41, 1743-1749.
- Murphy E M, Zachara J M and Smith S S 1990 Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. *Environmental Science and Technology* 24, 1507-1516.
- Naja G 2001 Réactivité des associations organo-minérales dans une lagune d'eaux de mine ; fixation du plomb par des matières biologiques. *In Géosciences*. pp 180. Henri Poincaré Nancy I, Nancy.
- Nam K and Kim J Y 2002 Role of loosely bound humic substances and humin in the bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environmental pollution* 118, 427-433.
- Neu T R 1996 Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews* 60, 151-166.
- Palmgren R, Jorand F, Nielsen P H and Block J C 1998 Influence of oxygen limitation on the cell surface properties of bacteria from activated sludge. *Water Science and Technology* 37, 349-352.
- Pichard A 2000a Fiche de données toxicologique et environnementales des substances chimiques : benzo(a)pyrène. pp 32. INERIS, Paris.
- Pichard A 2000b Fiche de données toxicologique et environnementales des substances chimiques : naphthalène. pp 37. INERIS, Paris.
- Pichard A 2000c Fiche de données toxicologique et environnementales des substances chimiques : phénanthrène. pp 27. INERIS, Paris.
- Pignatello J J and Xing B 1996 Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environmental Science and Technology* 30, 1-11.
- Poeton T S, Stensel H D and Strand S E 1999 Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by marine bacteria : effect of solid phase on degradation kinetics. *Water Research* 33, 868-880.

- Providenti M A, Flemming C A, Lee H and Trevors J T 1995a Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. FEMS Microbiology Ecology 17, 15-26.
- Providenti M A, Greer C W, Lee H and Trevors J T 1995b Phenanthrene mineralization by *Pseudomonas* sp. UG 14. World Journal of Microbiology and Biotechnology 11, 271-279.
- Rael J, Shelton S and Dayaye R 1993 Permeable Barriers to remove benzene : candidate media evaluation. Journal of Environmental Engineering 121, 411-415.
- Rasmussen G, Fremmersvik G and Olsen R A 2002 Treatment of creosote-contaminated groundwater in a peat/sand permeable barrier, a column study. Journal of Hazardous Materials.
- Richnow H H, Eschenbach A, Mahro B, Kästner M, Annweiler E, Seifert R and Michaelis W 1999 Formation of nonextractable soil residues : a stable isotope approach. Environmental Science and Technology 33, 3761-3767.
- Richnow H H, Eschenbach A, Mahro B, Seifert R, Wehrung P, Albrecht P and Michaelis W 1998 The use of ¹³C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. Chemosphere 36, 2211-2224.
- Rijnaars H H M, Norde W, Lyklema J and Zehnder A J B 1996 Bacterial deposition in porous media. Effects of cell-coating, substratum hydrophobicity and electrolyte concentration. Environmental Science and Technology 30, 2877-2883.
- Rojas-Avelizapa N G, Rodriguez-Vasquez R, Enriquez-Villanueva F, Martinez-Cruz J and Poggi-vraldo H M 1999 Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. Resources, Conservation and Recycling 27, 15-26.
- Scheibenbogen K, Zytner R G, Lee H and Trevors J T 1994 Enhanced removal of selected hydrocarbons from soil by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants and some chemical surfactant. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 59, 53-59.
- Scherer M M, Richter S, Valentine R L and Alvarez J J 2000 Chemistry and microbiology of permeable reactive barriers for *in situ* groundwater clean up. Critical Reviews in Microbiology 26, 221-264.
- Schmitt R, Langguth H R, Püttmann W, Rohns H P, Eckert P and Schubert J 1996 Biodegradation of aromatic hydrocarbons under anoxic conditions in a shallow sand and gravel aquifer of the lower Rhine Valley, Germany. Organic Geochemistry 25, 41-50.

- Sharak Genthner B R, Townsend G T, Lantz S E and Mueller J G 1997 Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 99-105.
- Simon F G and Meggyes T 2000 Removal of organic and inorganic pollutants from groundwater using permeable reactive barriers. Part 1. Treatment processes for pollutants. *Land contamination and reclamation* 8, 103-116.
- Stringfellow W T and Aitken M D 1994 Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonas isolated from a creosote-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 432-438.
- Sun H, Tateda M, Ike M and Fujita M 2003 Short- and long-term sorption/desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons onto artificial solids: effects of particle and pore sizes and organic matters. *Water Research* 37, 2960-2968.
- Tang W C, White J C and Alexander M 1998 Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 117-1221.
- Thomas F, Prélôt B, Villiéras F and Cases J M 2002 Electrochemical properties of solids at the aqueous-solid interface and heterogeneity of surface. *C.R. Geoscience* 334, 633-648.
- Van Dyke M I, Couture P, Brauer M, Lee H and Trevors J T 1993a *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant : structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 1071-1078.
- Van Dyke M I, Gulley S L, Lee H and Trevors J 1993b Evaluation of microbial surfactants for recovery of hydrophobic pollutants from soil. *Journal of Industrial Microbiology* 11, 163-170.
- Villiermaux J 1993 Génie de la réaction chimique : conception et fonctionnement des réacteurs, Paris. 448 p.
- Weissenfels W D, Klewer H J and Langhoff J 1992 Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles : influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36.
- Wilson A S, Davis C D, Williams D P, Buckpitt A R, Pirmohamed M and Park B K 1996 Characterization of the toxic metabolite(s) of naphtalène. *Toxicology* 114, 233-242.
- Wilson M S, Herrick J B, Jeon C O, Hinman D E and Madsen E L 2003 Horizontal transfer of phnAc dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically

- distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2172-2181.
- Wilson S C and Jones K C 1993 Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) : a review. *Environmental Pollution* 81, 229-249.
- Woo S H, Park J M and Rittmann B E 2001 Evaluation of the interaction between biodegradation and sorption of phenanthrene in soil-slurry systems. *Biotechnology and bioengineering* 73, 12-24.
- Yang Y, Chen R F and Shiaris M P 1994 Metabolism of naphthalene, fluorene and phenanthrene : Preliminary characterization of a cloned gene cluster from *Pseudomonas putida* NCIB 9816. *Journal of Bacteriology* 176, 2158-2164.
- Yee N and Fein J 2001 Cd adsorption onto bacterial surfaces : A universal adsorption edge. *Geochimica and Cosmochimica Acta* 65, 2037-2042.
- Zylstra G J and Kim E 1997 Aromatic hydrocarbon degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 408-414.
- Zylstra G J, Wang X P, Kim E and Didolkar V A 1994 Cloning and analysis of the genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Annals of the New-York Academy of Sciences* 721, 386-398.

Annexe

**PROTOCOLES ET METHODES DE CALCUL POUR
L'ETUDE DES PROPRIETES ACIDO-BASIQUES
DES BIOMASSES MICROBIENNES PAR TITRAGE
POTENTIOMETRIQUE**

1. REALISATION DU TITRAGE

Avant le titrage, une reprotonation des sites acides des ligands est nécessaire : Les suspensions bactériennes sont conditionnées pendant 12 à 24 heures à pH 2,5 dans une solution de $\text{NaClO}_4 + \text{HClO}_4$ (0,11 N) : Environ 10 mg de bactéries en suspension dans 50 ml de solution. Elles sont ensuite rincées par centrifugation en présence de NaClO_4 à pH7 et peuvent être conservées dans cette solution à 5°C avant titrage.

Pour les bactéries potentiellement riches en sulfates, les titrages peuvent être réalisés sur une biomasse rincée à l'eau distillée et avec NaHCO_3 afin d'échanger les sulfates associées à la paroi par des carbonates.

Le titrage s'effectue par ajout de soude 0,25 N jusqu'à un pH de 10,5.

Si la biomasse est lyophilisée, le tirage s'effectue avec 10mg/50ml de tampon ionique (NaClO_4) . Dans le cas d'une suspension liquide, la concentration finale en réacteur doit être de $2 \cdot 10^8$ bactéries/ml

2. DETERMINATION DES DIFFERENTES ACIDITES

Les courbes obtenues lors du titrage sont comparées à la courbe témoin de l'acide fort HClO_4 0,11 N. L'évaluation des différentes acidités (fortes, faibles et très faibles) de la bactérie est obtenue en combinant la fonction dérivée ($\partial\text{pH}/\partial v$, où v est le volume de soude ajouté) de la courbe de titrage et les fonctions de GRAN (1952) selon la méthode dite "combinée" décrite par Brunelot *et al* (1989) (Figure 1).

Les résultats obtenus par titrage potentiométrique sont exploités en utilisant différentes méthodes : la fonction de Gran pour la détermination des classes d'acidité, l'équation d'Henderson-Hasselbach pour la détermination de leur pKa respectif et l'évaluation de la charge de surface au cours du titrage par le calcul de l'excès ou du déficit de protons sur cette surface. Chacune des méthodes d'exploitation des données est décrite ci-dessous.

2.1. La méthode de Gran

La méthode de Gran établie en 1952 (Rossotti *et al.*, 1965), a été amplement utilisée pour :

- la détermination des points de neutralité ou d'équivalence des réactions acido-basiques en solution homogène (Gran, 1952),
- le contrôle des carbonates de la solution basique du titrant lors du calcul des constantes de stabilité (Martell *et al.*, 1992)
- la caractérisation des propriétés de complexation des substances humiques (Brunelot *et al.*, 1989 ; Andreux *et al.*, 1994).
- la caractérisation et la détermination des propriétés des groupements acides des biomasses fongiques afin de montrer leur importance dans la complexation des ions transuraniens ou métalliques (Munier-Lamy *et al.*, 1991 ; Deneux-Mustin *et al.*, 1994 ; Naja *et al.*, 1999 ; Naja, 2001).

Gran (1952) a décrit dans son étude la fonction F_G qui relie le pH au volume ajouté durant le titrage de plusieurs réactions, parmi lesquelles la réaction de neutralisation entre un acide fort et une base forte, un acide faible (mono, di ou poly acide) et une base forte, les réactions de complexation, de précipitation ou d'oxydo-réduction.

Dans notre cas, les expressions de Gran sont utilisées en considérant le titrage du témoin contenant seulement l'électrolyte support comme une réaction de neutralisation d'un acide fort et une base forte. La différence trouvée en comparant la fonction de Gran d'un échantillon et le témoin correspondant est donc attribuable à la réactivité des échantillons. La fonction de Gran s'exprime de la manière suivante :

$$F_G = (V_0+V)10^{(k_1-pH)} = k_2(Ve-V) \text{ à } pH < 7,$$

$$F_G = (V_0+V)10^{(k_3-pH)} = k_4(V-Ve) \text{ à } pH > 7.$$

où

V_0 est le volume initial de la réaction (ml), V le volume ajouté (ml), Ve le volume d'équivalence (ml) correspondant au volume du titrant ajouté et déterminé par la dérivée maximale du pH en fonction du volume (dpH/dV) et k_1, k_2, k_3, k_4 différentes constantes incluant la constante d'ionisation de l'eau, les coefficients d'activité et la concentration du titrant utilisée.

Cette fonction peut aussi être interprétée et décrite, comme une réaction globale de neutralisation à partir d'un bilan de masse effectué sur les protons :

- Pour le témoin :

$$F_G^* = (H^+) + (OH^-), \text{ où } (H^+) = (V_0 + V) * 10^{-pH} ; (OH^-) = (V_0 + V) * 10^{pH-14}$$

- Pour l'échantillon :

$$F_G = (H^+) + (OH^-) + (Y),$$

où (Y) est relative à la réactivité des nos échantillons. Les valeurs entre parenthèses (X) représentent la quantité de X dans le réacteur (mol).

2.2. Utilisation de la fonction de Gran

On utilise une représentation de la fonction de Gran $F_G = f(V)$ avec

$$F_G = (V_0+V)10^{(k_1-pH)} \text{ en milieu acide}$$

$$\text{et } F_G = (V_0+V)10^{(k_2-pOH)} = (V_0+V)10^{(k_2+ pH -14)} \text{ en milieu basique}$$

V_0 : le volume initial, V : le volume de titrant ajouté (v' et v'')

Par ailleurs, on détermine le point d'équivalence Ve en utilisant la dérivé (dpH/dV)

Les tangentes respectives à FG dans les domaines très acides et basiques permet de différencier trois régions dans l'ensemble de la courbe de titrage, délimitées par une première zone d'acidité forte ($pH < 4$) attribuable à des acidités minérales (phosphorique ou sulfonique) ou organique (groupement carboxylique fixé à un noyau aromatique), une deuxième zone d'acidité faible ($4 < pH < 7$) attribuable aux acidités polycarboxyliques ou à des groupements acides aminés des protéines et une dernière zone relative à des acidités très faibles ($pH > 7$) assignées aux groupements acides aminés, à la deuxième ionisation du groupement phosphate ou à l'expression des hydroxyles des groupements phénoliques.

La figure 1 montre les trois zones délimitées par le témoin, ainsi la première zone est comprise entre $V_a - V_{a^*}$, la deuxième entre $(V_e - V_a) - (V_{e^*} - V_{a^*})$ et la dernière entre $(V_b - V_e) - (V_{b^*} - V_{e^*})$. V_a et V_{a^*} correspondent aux volumes acides de l'échantillon et du témoin respectivement, V_e et V_{e^*} sont les volumes d'équivalence de l'échantillon et du témoin respectivement et V_f et V_{f^*} sont les volumes totaux de l'échantillon et du témoin respectivement. Rappelons que l'écart entre V_{a^*} et V_{e^*} doit être négligeable dans le titrage d'une solution témoin titrée non carbonatée ($V_{a^*} \cong V_{e^*}$).

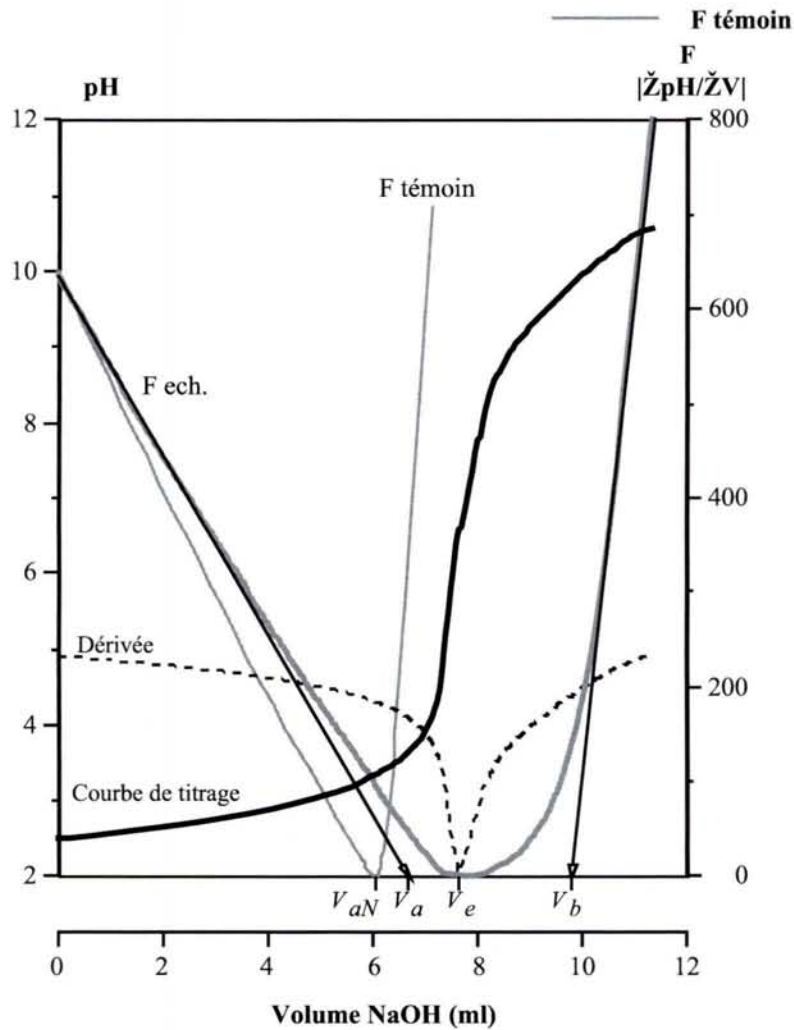


Figure 1 : Fonction de GRAN déduite de la courbe de titrage de plusieurs acides faibles, en présence d'acide fort, par la soude.

Les relations utilisées pour le calcul des différents types d'acidités sont les suivantes :

$$A_F (\text{me.l}^{-1}) = \frac{(V_a - V_a^*)}{(V_0 + V_f)} * N_0$$

$$A_f (\text{me.l}^{-1}) = \frac{(V_e - V_a) - (V_e^* - V_a^*)}{(V_0 + V_f)} * N_0$$

$$A_{ff} (\text{me.l}^{-1}) = \frac{(V_b - V_e) - (V_b^* - V_e^*)}{(V_0 + V_f)} * N_0$$

L'acidité totale $A_{Total} = A_F + A_f + A_{ff}$.

$$A_{Total} (\text{me.l}^{-1}) = \frac{(V_b - V_b^*)}{(V_0 + V_f)} * N_0 \cong \frac{(V_f - V_f^*)}{(V_0 + V_f)} * N_0$$

Toutes ces valeurs sont connues avec une incertitude $\Delta = \frac{(V_b^* - V_a^*)}{(V_0 + V_f)}$, qui affecte principalement la détermination des acidités très faibles.

Où

- A_{Total} , A_F , A_f , A_{ff} , représentent respectivement les acidités organiques totale, forte, faible et très faible de l'échantillon (me.l^{-1}),
- N_0 est la concentration du titrant (me.l^{-1}) et V_0 est le volume initial (L),
- V_f^* et V_f sont les volumes totaux ajoutés respectivement au témoin et à un échantillon (ml),
- V_e^* et V_e sont les volumes d'équivalence du témoin et de l'échantillon (L),
- V_a^* et V_a sont les volumes acides du témoin et de l'échantillon (L) déterminés à partir de la fonction de Gran
- V_b^* et V_b sont les volumes basiques du témoin et de l'échantillon (L) déterminés à partir de la fonction de Gran

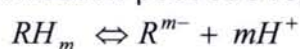
Pour exprimer les acidités en les valeurs obtenues de me.l^{-1} en me.g^{-1} , le facteur multiplicatif $(V_0 + V_f)/M$ est introduit dans chaque, M étant la masse du solide titré exprimée en grammes.

Ces relations permettent d'évaluer les contributions relatives (%) des différents types d'acidités dans l'échantillon.

2.3. Méthode d'Henderson-Hasselbach

Afin de calculer les différentes constantes d'ionisation pK_a des acidités faibles et très faibles, l'équation d'Henderson-Hasselbach a été utilisée.

La réaction chimique globale d'ionisation peut être représentée comme suit :



$$K_a = \frac{[H^+]^m [R^{m-}]}{[RH_m]} \Leftrightarrow pK_a = pH + m \log \frac{1-\alpha}{\alpha}$$

L'équation Henderson–Hasselbach relie les paramètres d'ionisation à l'équilibre des différents sites et fournit une valeur de pKa, définie comme la constante apparente correspondant à la dissociation de 50 % des groupes acides, provenant de la valeur du pH lorsque $\alpha = 0,5$.

L'équation d'Henderson-Hasselbach permet de déterminer les pKa moyens (pKam) respectifs des acidités faibles et très faibles à partir des courbes de titrage

Les paramètres de dissociation de chacune des acidités faibles (α_f) et très faibles (α_{tf}) sont définis par les expressions suivantes :

Acidité faible :

$$\alpha(A_f) = \frac{1}{A_f} * \left\{ \frac{(A_0 + N_0)(V_0^* V_f - V_0 V_f^*)}{V_0^* (V_0^* + V_f^*)} - A_F \right\}$$

Acidité très faible :

$$\alpha(A_{tf}) = \frac{1}{A_{tf}} * \left\{ \frac{(A_0 + N_0)(V_0^* V_f - V_0 V_f^*)}{V_0^* (V_0^* + V_f^*)} - A_F - A_f \right\}$$

où A_0 est la concentration d'acide initiale ($me.L^{-1}$) et V_0^* est le volume initial du témoin (ml).

Ces coefficients sont déterminés en comparant, les courbes de titrages réalisées sur la suspension bactérienne en présence de $HClO_4$ à une courbe de titrage témoin obtenu par l'acide fort seul. Les coefficients de dissociation des sites acides, variant avec le pH, sont calculés pour chaque valeur de pH (pas 0,1) grâce à la formule suivante:

$$\alpha_f = \frac{1}{A_f} \cdot \left[\frac{(A_0 + N_0) \cdot (V - V^*)}{(V_0 + V^*)} - A_F \right]$$

et

$$\alpha''_a = \frac{1}{A_{tf}} \cdot \left[\frac{(A_0 + N_0) \cdot (v'' - v')}{(v_i + v')} - A_f - A_F \right]$$

avec A_0 : normalité de l'acide
 N_0 : normalité de la base
 A_F : acidité forte de la bactérie
 A_f : acidité faible de la bactérie
 A_{tf} : acidité très faible de la bactérie
 bactérienne

v_i : volume initial de la solution
 v' : volume de soude employé pour titrer l'acide $HClO_4$
 v'' : volume de soude employé pour titrer la suspension

Une fois, les coefficients de dissociation (α'_a et α''_a) déterminés, les constantes d'acidité K_a , sont déterminées par la loi d'action de masse de l'acide faible correspondant.

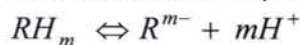
Une constante d'acidité moyenne K_m est déterminée pour $\alpha_a=0,5$. Dans ce cas $pH = pK_m$.

L'équation d'Henderson-Hasselbach permet la détermination de la constante d'acidité moyenne (pK_m) des différents types d'acidités.

Ces constantes d'acidité moyennes sont indicatrices avant tout d'une distribution des sites acides et ne doivent pas être considérés en valeur absolue ou comme des grandeurs thermodynamiques.

Afin de calculer les différentes constantes d'ionisation pK_a des acidités faibles et très faibles, **l'équation d'Henderson-Hasselbach** a été utilisée.

La réaction chimique globale d'ionisation peut être représentée comme suit :



$$K_a = \frac{[H^+]^m [R^{m-}]}{[RH_m]} \Leftrightarrow pK_a = pH + m \log \frac{1 - \alpha}{\alpha}$$

L'équation Henderson–Hasselbach relie les paramètres d'ionisation à l'équilibre des différents sites et fournit une valeur de pK_a , définie comme la constante apparente correspondant à la dissociation de 50 % des groupes acides, provenant de la valeur du pH lorsque $\alpha = 0,5$. Le paramètre de dissociation de chacune des acidités faibles (α_f) et très faibles (α_{tf}) est définie par les expressions suivantes :

Acidité faible :

$$\alpha(A_f) = \frac{1}{A_f} * \left\{ \frac{(A_0 + N_0)(V_0^* V_f - V_0 V_f^*)}{V_0 * (V_0^* + V_f^*)} - A_F \right\}$$

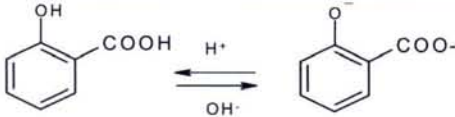
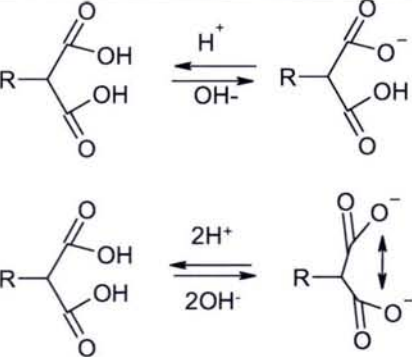
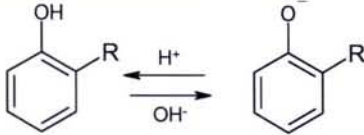
Acidité très faible :

$$\alpha(A_{tf}) = \frac{1}{A_{tf}} * \left\{ \frac{(A_0 + N_0)(V_0^* V_f - V_0 V_f^*)}{V_0 * (V_0^* + V_f^*)} - A_F - A_f \right\}$$

où A_0 est la concentration d'acide initiale ($me.L^{-1}$) et V_0^* est le volume initial du témoin (ml).

BIBLIOGRAPHIE

- Andreux F, Munier-Lamy C, 1994. Genèse et propriétés des molécules humiques. In: Pédologie. Tome 2. Constituants et propriétés du sol., Première ed (Bonneau M, Souchier B, eds). Paris: Masson; 109-141.
- Brunelot G, Adrian P, Rouiller J, Guillet B, Andreux F, 1989. Determination of dissociable acid groups of organic compounds extracted from soils, using automated potentiometric titration. *Chemosphere* 19:1413-1419.
- Deneux-Mustin S, Rouiller J, Durecu S, Munier-Lamy C, Berthelin J, 1994. Détermination de la capacité de fixation des métaux par les biomasses microbiennes de sols, des eaux et des sédiments : Intérêt de la méthode du titrage potentiométrique. *Géosciences de surface/Surface Geosciences*. T319, Série II:1057-1062.
- Gran G, 1952. Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst* 77:661-671.
- Martell AE, Motekaitis RJ, 1992, Determination and use of stability constants. United States of America: VCH Publishers, INC.
- Munier-Lamy C, Arian PH, Berthelin J, 1991. Fate of organo-heavy metal complexes of sludges from domestic wastes in soils: A simplified modelization. *Toxicological and Environmental Chemistry*. 31 - 32:527-538.
- Naja,G, 2001. Réactivité des associations organo-minérales dans une lagune d'eaux de mine ; Fixation du plomb par des matières biologiques. (Thèse de Doctorat).Université Henri Poincaré.
- Naja, G, Deneux Mustin S, Mustin C, Rouiller R, Munier-Lamy C, Berthelin J, 1999. Potentiometric titration: a dynamic method to study the metal binding mechanism of microbial biomass. (Amils R, Ballester A, eds). Madrid, Spain.: Elsevier;201-210.
- Rossotti FJC, Rossotti H, 1965. Potentiometric titrations using Gran plots. *Journal of chemical Education*. 42:375-377.

Fonction Organique	Réaction d'ionisation	pka ₁	pka ₂
R-Acide phosphorique	$\text{R-O-P(=O)(OH)}_2 \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{R-O-P(=O)(OH)}_2\text{O}^-$	2,8	6,8
R-Acide sulfonique	$\text{R-O-S(=O)}_2\text{OH} \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{R-O-S(=O)}_2\text{O}^-$	2,8	
Ar-Acide carboxylique		3,2	11,4
R-Acide carboxylique	$\text{R-C(=O)OH} \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{R-C(=O)O}^-$	4-5	
Acide polycarboxylique		4-5	
Acide aminé	$\text{R-CH(NH}_3^+\text{)COOH} \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{R-CH(NH}_3^+\text{)COO}^- \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{R-CH(NH}_2\text{)COO}^-$ <p style="text-align: center;"> Cation Neutre Anion < pH 5-6 environ pH 6-7 > pH 7 </p>	4-7	8-9
Amine aliphatique	$\text{R-NH}_2 \xrightleftharpoons[\text{OH}^-]{\text{H}^+} \text{R-NH}_3^+$	5,8 – 7	9,5-10
Phénol		9,8	

Annexe 2. Réactivité acido-basique des principales fonctions organiques des constituants de la biomasse.

Monsieur **LEGLIZE Pierre**

DOCTORAT de l'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en GEOSCIENCES

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 1027

Nancy, le 12 janvier 2005

Le Président de l'Université



Résumé

Les Barrières Perméables Réactives (BPR) constituent une voie nouvelle de traitement des aquifères contaminés. La BPR est implantée de telle sorte que le flux d'eau contaminée (ou plume) s'écoule passivement suivant le gradient naturel au travers du matériau réactif (EPA, 1998). Le matériau utilisé doit constituer une barrière pour les contaminants qui y sont piégés, dégradés ou transformés en éléments non toxiques. Actuellement cette technique est principalement utilisée pour traiter des pollutions par des éléments en traces métalliques ou des polluants organo-chlorés. Les interactions bactéries – HAP – matériaux ont été étudiées en vue d'évaluer la faisabilité de cette technique dans le cas d'une contamination par des HAP. Différents matériaux ont été utilisés: charbon actif (CA), pouzzolane recouverts (PzF) ou non (Pz) de composés organiques. Des expériences d'adsorption/désorption du phénanthrène (PHE) en batch ont montré que CA présentait une capacité d'adsorption 100 à 10000 fois plus importante que PzF et Pz. La biodégradation de PHE en présence de CA est plus importante par rapport à des essais sans matériaux. Les propriétés des bactéries physiologiques affectent leur capacité à dégrader le PHE adsorbé. La production de biofilm semble accentuer la dégradation de PHE en présence de CA. De plus, l'adsorption des bactéries capables de produire des biofilms sur CA recouvert de PHE est plus importante par rapport aux observations réalisées avec CA. Lors d'essais en colonne, son inoculation par une souche dégradant les HAP améliore son efficacité : dégradation de PHE adsorbés sur CA et augmentation du retard sur le temps de sortie de PHE.

Mots-clés : BPR, HAP, biodégradation, charbon actif, adsorption bactérienne, essais en colonne

Abstract

Permeable Reactive Barrier (PRB) is a new cost effective way for the remediation of contaminated groundwater. Reactive material is placed in the subsurface where a plume of contaminated groundwater moves through it as it flows under its natural gradient. PRBs are used to remove halogenated hydrocarbons or heavy metals, but up to now Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) were rarely considered. We are investigating PAH – bacteria – materials interactions in order to validate the feasibility of using PRB for PAH contamination. Phenanthrene (PHE) was used as model PAH. PHE Adsorption/desorption kinetics onto different candidate materials such as activated carbons (CA), pouzzolane (Pz) and pouzzolane coated with heavy fuel (PzF) were investigated. PHE biodegradation were performed on batch using PAH degrading bacteria and the PRB materials. Results show that CA seems to be a good media for PRB process : Phenanthrene sorption capacity of CA is 100 fold higher than PzF and 10000 fold than Pz. Phenanthrene mineralization in the presence of CA is significantly higher than in treatment with phenanthrene only. Bacterial properties affected PHE biodegradation. Biofilm production seemed to improve PHE desorption and biodegradation by PAH degrading bacteria. Bacterial adsorption on AC covered with PHE was greater with bacteria producing biofilm. Column studies showed that inoculation of the column improved its efficiency : adsorbed PHE degradation and increased retardation of PHE.

Key-words : PRB, PAH, biodegradation, activated carbon, sorption, bacterial adhesion, column studies