



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

THESE

Présentée devant l'Université de METZ
pour obtenir le Diplôme de Doctorat d'Université
Spécialité : Toxicologie (N° D'ordre : 22)

par

Jean-Pierre FLAMBEAU

soutenue le 12 Octobre 1990



**ESSAI DE BIOTRANSFORMATION
DU CARBAZOLE**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1990 0345
Cote	S/M3 90/16
Loc	Magasin

Membres du Jury : J.C. Block, Président
J. Le Petit, Rapporteur
P. Vasseur, Rapporteur
D. Cagnant
J.M. Ziegler
M. Delavarenne

1. INTRODUCTION

De nombreuses bactéries interviennent dans les différents cycles de dégradation ou de synthèse de la matière organique (cycle du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore).

Elles peuvent agir jusqu'à la minéralisation des substances organiques, les rendant alors assimilables par les végétaux, point de départ de toute chaîne alimentaire.

Certaines bactéries sont même capables d'utiliser des xénobiotiques (molécules d'origine industrielle) comme source de carbone et d'énergie pour leur synthèse cellulaire (Stouthamer, 1977). C'est dire que presque toutes les molécules peuvent être biodégradées ou biotransformées.

Ainsi, la biotransformation de certaines molécules industrielles et leur valorisation par voie biologique, sont envisageables.

Au terme d'une analyse bibliographique ayant trait à la biodégradation des hydrocarbures (chapitre 2), le but de ce travail expérimental est d'étudier le mécanisme de dégradation, par des bactéries, du carbazole (sous-produit de cokéfaction) (Figure 1), et d'apprécier les conditions optimales leur permettant de produire dans le milieu de culture, des composés correspondant à des dérivés de l'indole, ou mieux encore, à l'indole lui-même.

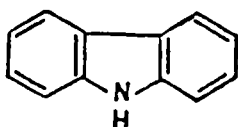


Figure 1 : Formule développée du carbazole.

La biotransformation du carbazole en composé indolique en ferait alors une molécule à forte valeur ajoutée, susceptible d'une utilisation industrielle pour, par exemple, la synthèse d'acides aminés aromatiques comme le tryptophane. La voie bactérienne pour synthétiser l'indole a été retenue car il s'est avéré, jusqu'alors, impossible d'obtenir cette molécule par voie chimique.

La biotransformation du carbazole comme source de carbone pour les bactéries a été étudiée selon trois directions correspondant à une mise en solution différente du produit étudié :

- le carbazole seul,
- le carbazole en présence de tensioactifs de synthèse,
- l'acide carbazole monosulfonique.

Ces trois différents substrats sont testés afin :

(a) de sélectionner plusieurs bactéries capables d'utiliser le carbazole sous ses différentes formes (chapitre 4) ;

(b) de déterminer le substrat le plus biodisponible et le plus favorable à la dégradation et d'étudier l'évolution des cultures bactériennes sur le carbazole en fonction du temps et en fonction

des paramètres suivants : pH, densité cellulaire, concentrations en carbone, azote et phosphore, ainsi que la solubilité de l'hydrocarbure (chapitre 5).

Au terme de cette double approche, les mesures et observations obtenues conduisent à optimiser les milieux de culture en mettant en évidence les conditions les plus favorables d'une part, à la croissance bactérienne (taux de croissance) et d'autre part, à la dégradation du substrat carboné (taux de conversion du substrat).

Les milieux de culture présentant les conditions les plus favorables à la dégradation sont retenus pour une analyse qualitative des métabolites extracellulaires produits par les bactéries testées (chapitres 6 et 7).

Les analyses qualitatives réalisées par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse permettent l'identification de certains composés contenus dans les milieux de culture (produits indoliques ou autres).

Les structures indoliques présentes sont ensuite quantifiées afin de sélectionner la souche bactérienne, le substrat et les conditions les plus favorables à la production de noyaux indoles. Enfin, avant de conclure, plusieurs voies de dégradation du carbazole sont proposées.

2. BIBLIOGRAPHIE

2.1. LE CARBAZOLE

Le carbazole, généralement considéré comme une impureté de distillation des goudrons, n'est pas un produit de haute valeur ajoutée. Il est cependant utilisé dans la fabrication de plaques photographiques sensibles aux U.V. et de colorants. En laboratoire, il est utilisé comme réactif de détection de la lignine, des sucres et du formaldéhyde (IARC, 1983).

2.1.1. ORIGINE DU CARBAZOLE

Le carbazole est présent dans les goudrons produits lors de la cokéfaction du charbon. Les goudrons, mélanges de molécules allant du benzène aux polyaromatiques lourds, subissent pour être exploitables un premier traitement de distillation primaire consistant en sa séparation en plusieurs coupes d'huiles.

Une séparation typique est présentée sur le tableau 1.

Tableau 1 : Catégorie et répartition des différentes coupes obtenues par distillation des goudrons.

Intervalle de température de distillation (°C)	Coupe d'huile	%
180°C	Huile légère	0,5 - 1,0
180 - 205°C	Huile phénolique	2 - 4
200 - 230°C	Huile naphthalénique	8 - 12
240 - 290°C	Huile d'acénaphène	6 - 14
260 - 310°C	Huile anthracénique	7 - 20
320 - 370°C	Huile de chrysène	7 - 20
Résidu de distillation	Brai	48 - 52

Le goudron est séparé par distillation en six coupes d'huiles, la phase la plus lourde correspondant au brai. En France, les huiles légères sont fournies à une unité de traitement des benzols ; les huiles phénoliques et naphthaléniques sont traitées pour récupérer le phénol, les crésols et les xylénols ainsi que le naphtalène.

Les huiles anthracéniques traitées conduisent à la production d'un mélange d'anthracène, de phénanthrène et de carbazole en proportions variables. Les composés peuvent être ensuite purifiés par l'utilisateur.

2.1.2. DESCRIPTION DE LA MOLECULE DE CARBAZOLE

Le carbazole est hétérotricyclique (Figure 1) de formule $C_{12}H_9N$ (PM = 167,21 g).

Son aromaticité lui confère une structure plane (excepté l'hydrogène de l'azote) et un plan de symétrie. Le point de fusion du carbazole est de 247 - 248°C et son point d'ébullition s'élève à 355°C à 760 mm de mercure.

Le carbazole, molécule hydrophobe, est très peu soluble dans l'eau. Il est légèrement soluble dans l'éther, le benzène, le toluène, la pyridine, le méthanol et l'éthanol (1 g/l à 25°C d'après Montreuil & Spik (1963)), mais très soluble à chaud dans l'acétone, l'éthanol, le benzène ainsi que l'éther de pétrole, les acides acétique et sulfurique concentrés. Le carbazole est aussi soluble dans le dichlorométhane, le chloroforme et le tétrachlorure de carbone (Zelent & Durocher, 1981 ; Balsells & Frasca, 1985).

2.1.3. TECHNIQUES DE DOSAGE DU CARBAZOLE

L'aromaticité et l'hétéroatome donnent à la molécule les propriétés

- . d'absorption en U.V.
- . d'émission fluorescente
- . d'émission phosphorescente.

Sa structure hydrocarbonée lui confère la propriété de résister aux hautes températures et d'être dosé par chromatographie en phase gazeuse et identifié par spectrométrie de masse.

Le carbazole en tant que molécule aromatique est caractérisé par un spectre U.V. (Figure 2).

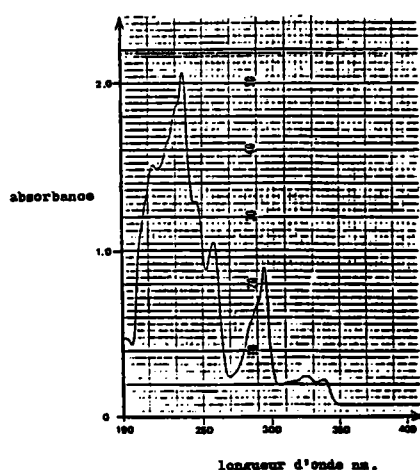


Figure 2 : Spectre U.V. du carbazole dans l'éthanol à 95%.

Le dosage quantitatif du carbazole peut donc être réalisé par spectrophotométrie U.V. (par exemple à 254 nm), la densité optique étant directement proportionnelle à sa concentration et par chromatographie HPLC équipé d'un détecteur U.V. Sous lumière U.V., le carbazole se caractérise par ses propriétés de fluorescence et de phosphorescence. Il peut donc être dosé quantitativement

par spectrofluorimétrie. Le maximum d'émission en fluorescence est obtenu à la longueur d'onde de 335 nm avec une lampe au xénon 150-W comme source d'excitation (Furusawa *et al.*, 1983).

Le carbazole peut aussi être dosé avec une excitation en U.V. à 297 nm (Lakowicz & Anderson, 1980).

Comme le phénanthrène et l'anthracène, le carbazole et ses dérivés peuvent être dosés directement par chromatographie en phase gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse (Figure 4), et ceci après séparation sur colonne capillaire à phase stationnaire OV-73 (25 m x 0,3 mm), OV-61 (25 m x 0,3 mm) et OV-1701 (25 m x 0,3 mm) (Dorbon *et al.*, 1982 ; Dorbon *et al.*, 1984a ; Dorbon *et al.*, 1984b ; Ignatiadis *et al.*, 1985 ; Ignatiadis *et al.*, 1986a ; Ignatiadis *et al.*, 1986b).

Certaines phases stationnaires (OV-1) n'ont aucune affinité avec les composés même très faiblement polaires. Dans ce cas, il est nécessaire de dériver l'hétéroatome par une silylation (Figure 3) pour obtenir une meilleure définition et une meilleure séparation.

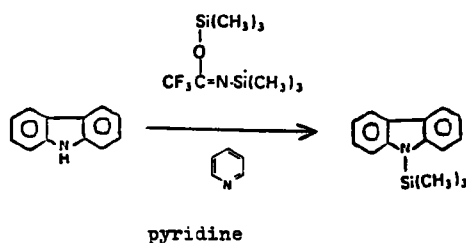


Figure 3 : Réaction de dérivation du carbazole dissous dans la pyridine par silylation avec le réactif BS TFA (N, O-bis- (Triméthylsilyl) trifluoro-acétamide) (Interchim).

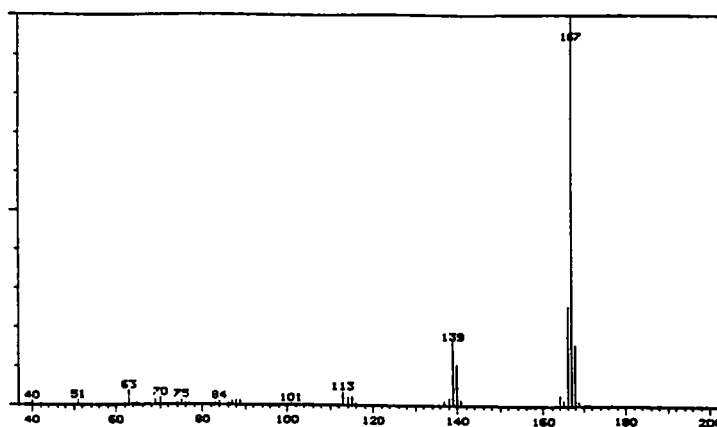


Figure 4 : Spectre de masse du carbazole (Impact Electronique à 70 eV).

Le carbazole présente une faible fragmentation en spectrophotométrie de masse à impact électronique. Les ions m/e 139 ($C_{11}H_7$) (13%) et 140 ($C_{11}H_8$) (11%) résultent de la perte de HCN et H_2CN de l'ion moléculaire. Leur perte implique une rupture considérable du squelette de la molécule, ce qui explique la faible fragmentation (Porter & Baldas, 1971).

2.1.4. TOXICITE DU CARBAZOLE

La carcinogénicité du carbazole reste à mettre en évidence. En effet, chez la souris, le carbazole semble ni tératogène, ni actif lors de tests à court terme (IARC, 1983) ; par contre, une augmentation du nombre de nodules néoplasiques dans le foie a été observée en fonction de la dose de carbazole administrée par voie orale et des cancers hépatocellulaires ont été signalés.

De même, des tumeurs bénignes ou cancéreuses de l'estomac ont été observées chez les animaux ayant reçu de hautes doses de carbazole.

Différentes études ont été menées avec d'autres organismes. La diversité des résultats ne permet pas non plus de conclure sur la carcinogénicité du carbazole.

Tetrahymena pyriformis subit une inhibition de croissance qui est fonction de la dose de carbazole administrée (Schultz *et al.*, 1980 ; Schultz, 1980 ; Schultz *et al.*, 1982).

Le carbazole n'a pas montré d'effet sur *Salmonella typhimurium* (IARC, 1983).

Les hépatocytes de rat sont capables de dégrader le 7H-dibenzo (c,g) carbazole.

Plusieurs métabolites ont été identifiés, mais aucune toxicité n'a été observée (Stong & Warshawsky, 1983).

De toute façon et dans tous les cas, il faut manipuler prudemment le carbazole et éviter toute contamination du manipulateur.

2.2. VOIES DU METABOLISME BACTERIEN

Ce chapitre peut être considéré comme étant une introduction au chapitre suivant dans lequel sont rassemblées les voies de dégradation des substrats carbonés.

En effet, dans ce chapitre sont présentées les différentes sources de matière et d'énergie qui entretiennent la vie cellulaire.

Ces différents paramètres permettront de comprendre les raisons qui font qu'une bactérie peut dégrader une source de carbone.

Le métabolisme bactérien peut être défini comme étant la somme de toutes les réactions enzymatiques qui contribuent à l'échange de matière et d'énergie entre la cellule et son environnement.

Le métabolisme se caractérise par les fonctions spécifiques suivantes :

- extraire l'énergie chimique soit des sources de carbone du milieu, soit de la lumière solaire
- transformer les aliments exogènes en précurseurs des composants macromoléculaires de la cellule
- assembler ces matériaux en protéines, acides nucléiques, lipides ou en autres constituants caractéristiques de la cellule.

2.2.1. LES SOURCES DE CARBONE ET D'AZOTE

Les cellules peuvent être divisées en deux grands groupes sur la base de la forme chimique du carbone qu'elles empruntent au milieu extérieur :

- . les cellules autotrophes utilisent le gaz carbonique comme unique source de carbone et élaborent à partir de celui-ci leurs biomolécules carbonées. Si les cellules autotrophes se rencontrent surtout dans le monde végétal, il existe tout de même certaines bactéries qui ont les mêmes caractéristiques ;

- . les cellules hétérotrophes ne peuvent pas utiliser le gaz carbonique et doivent emprunter à leur milieu le carbone sous une forme relativement complexe comme par exemple le glucose ou bien un hydrocarbure. La plupart des microorganismes sont hétérotrophes, ainsi que les cellules des animaux supérieurs. Ce sont bien évidemment les microorganismes hétérotrophes qui nous intéressent pour l'étude de la dégradation du carbazole.

Les microorganismes montrent une souplesse métabolique considérable et sont capables de s'adapter à la nature et à la quantité des différentes sources de carbone disponibles dans leur milieu de culture.

Par exemple, *Escherichia coli* peut utiliser comme unique source de carbone, non seulement le glucose, mais aussi d'autres sucres, le glycérol, les aminoacides ou même des molécules simples comme l'éthanol ou l'acétate.

De ce fait, certaines bactéries sont capables de s'adapter aux sources de carbone complexes comme les hydrocarbures (pétrole, huile...) et à de nombreux produits de synthèse.

Comme le carbone, l'azote est un constituant élémentaire des protéines, des acides nucléiques et d'autres biomolécules importantes.

Cependant, la plupart des organismes ne peut utiliser l'azote N_2 chimiquement inerte.

Ils doivent recevoir leur azote sous forme combinée (Nitrate, Ammoniaque, Aminoacides) et comme il est peu abondant, il subit un cycle continu.

De plus, comme pour le carbone, les microorganismes peuvent montrer une souplesse métabolique considérable dans le choix de la source d'azote.

Escherichia coli peut en effet utiliser d'autres sources d'azote en remplacement de l'ammoniaque : divers aminoacides, les purines, pyrimidines, la choline...

Lorsque les cellules d'*Escherichia coli*, cultivées en présence d'ammoniaque comme source d'azote, sont placées dans un milieu riche en aminoacides exogènes, les cellules cessent d'utiliser l'ammoniaque et emploient les acides aminés préformés.

Toutes ces réactions de transformation du carbone et de l'azote font partie du métabolisme cellulaire. Or ce métabolisme, que cela soit pour les bactéries ou bien pour les autres cellules, est divisé en deux phases principales : le catabolisme et l'anabolisme.

2.2.2. CATABOLISME ET ANABOLISME

Le catabolisme correspond à la partie du métabolisme des cellules où les sources de carbone et d'azote, qui proviennent du milieu de culture ou des propres réserves de la cellule, sont dégradées enzymatiquement en une série de molécules plus simples.

Le catabolisme s'accompagne de la libération d'énergie libre qui est conservée sous forme de liaisons phosphates, riches en énergie, en adénosine triphosphate ATP (Best, 1987).

L'anabolisme est la phase de biosynthèse du métabolisme. La synthèse enzymatique, à partir de précurseurs simples, aboutit à la formation de molécules relativement volumineuses qui entrent dans la composition des cellules, telles que les polysaccharides, les acides nucléiques, les protéines et les lipides.

L'anabolisme nécessite un apport en énergie libre, énergie qui sera fournie par l'ATP (Best, 1987).

En définitive, l'anabolisme permet, entre autres, la division cellulaire (production de biomasse) et l'excrétion dans le milieu de culture de molécules particulières comme par exemple les tensioactifs (cf. 2.7.1.).

Les précurseurs simples utilisés lors des synthèses enzymatiques, proviennent du catabolisme des sources de carbone et d'azote.

La croissance cellulaire et la production de molécules dans le milieu de culture sont donc deux facteurs mesurables qui permettent d'affirmer que des sources de carbone et d'azote sont utilisées par l'organisme étudié.

Le catabolisme et l'anabolisme sont donc intimement liés dans la vie de la cellule.

Chaque voie catabolique et anabolique consiste en une suite de réactions successives catalysées par des enzymes. Les enzymes sont donc les unités catalytiques des métabolismes intermédiaires.

De nombreuses réactions mettent en jeu des transferts enzymatiques d'atomes d'hydrogène, de molécules d'eau ou d'unités fonctionnelles comme des groupes amino, acétyl, phosphate, méthyl, formyl, carboxyl ou adényl (Best, 1987).

Trois niveaux de complexité dans l'organisation des systèmes enzymatiques peuvent être observés :

- . les enzymes sont en solution dans le cytoplasme à l'état de molécules séparées. Les métabolites de plus faibles dimensions que l'enzyme diffusent d'une enzyme à l'autre suivant la séquence imposée (Figure 5) (Lehninger, 1982) ;

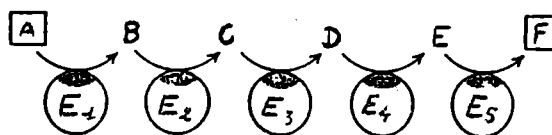


Figure 5 : Système enzymatique soluble ou dissocié avec des intermédiaires diffusant B, C, D, E.

- les enzymes sont liées et fonctionnent ensemble pour former un complexe multienzymatique. De tels complexes indissociables diminuent les distances que doivent parcourir les métabolites en suivant les étapes de la séquence. Les métabolites peuvent même être liés de façon covalente au complexe multienzymatique comme dans le système "acide gras synthétase" des levures (Lehninger, 1982) ;

- les systèmes enzymatiques sont associés à des structures supramoléculaires comme les membranes ou les ribosomes. Un exemple important est fourni par la chaîne des enzymes transporteurs d'électrons qui assure le transfert des électrons d'un substrat vers l'oxygène chez les cellules hétérotrophes (Lehninger, 1982).

Le métabolisme procède donc par étapes enzymatiques successives en produisant à chaque fois un intermédiaire appelé métabolite.

Or les voies cataboliques ne permettent pas toujours la dégradation enzymatique totale d'une source de carbone ou d'azote, soit parce que l'organisme ne possède pas l'enzyme nécessaire à la dégradation, soit parce que la vitesse de dégradation de l'enzyme est trop lente par rapport à celle des enzymes qui ont produit les précurseurs.

Dans tous les cas, le résultat est identique ; une accumulation du métabolite dans la cellule est tout d'abord observée, puis celui-ci est excrété dans le milieu de culture.

La dégradation d'une source de carbone ou d'azote a donc pour but de produire des électrons, des atomes d'hydrogène, des groupements et de l'énergie qui entrent directement dans les voies de l'anabolisme de la bactérie permettant la biosynthèse du matériel cellulaire, la division cellulaire, la maintenance de la cellule...

Quant au catabolisme des sources de carbone et d'azote, il permet la production de métabolites intra et extra-cellulaires et la production de gaz carbonique et d'ammoniaque.

En fait, la bactérie tente souvent d'utiliser en totalité la source de carbone. Pour observer la production de métabolites dans le milieu de culture, il faut :

- . soit sélectionner une souche incapable de dégrader certaines structures (carence enzymatique),
- . soit placer la souche dans un milieu tel que certaines voies métaboliques soient inhibées ou affaiblies (cf. 2.6.).

2.3. LES METABOLISMES DE DEGRADATION DES HYDROCARBURES

La biodégradation ou biotransformation d'une molécule comme le carbazole peut conduire, grâce à des mécanismes d'hydrogénation, d'oxydation, à la formation de nouvelles structures aromatiques ou non après ouverture de leurs cycles et élimination des chaînes latérales ainsi formées. C'est dire, dans ces conditions, que l'étude de la biodégradation couvre un champ large de réactions non seulement propre aux molécules aromatiques, mais aussi relatif à la biotransformation des cycloalcanes et même des alcanes.

Aussi ce paragraphe sur le métabolisme des dégradations est-il présenté en trois parties correspondant respectivement aux

- . alcanes, alcènes
- . cycloalcanes, cycloalcènes
- . aromatiques.

Pour chacune des parties traitées, l'information scientifique existante est rassemblée afin de mettre en évidence, si possible, des lois générales de biodégradation et tenter de définir un mécanisme théorique de la biodégradation du carbazole par les bactéries.

2.3.1. METABOLISME DES ALCANES ET DES ALCENES CHEZ LES BACTERIES

Différents mécanismes de dégradation sont mis en évidence suivant le taux d'oxygène dissous dans le milieu de culture. L'assimilation totale de ces hydrocarbures par les bactéries sera étudiée en milieu aérobie, tandis que des mécanismes de déshydrogénation seront observés en milieu anaérobie.

2.3.1.1. En milieu aérobie

Le métabolisme de dégradation des alcanes et des alcènes s'effectue chez les bactéries en milieu aérobie par une série d'étapes enzymatiques qui conduisent successivement à la formation d'alcool puis d'aldéhyde et enfin d'acide carboxylique (Atlas, 1981).

L'acide carboxylique formé est ensuite assimilé par la bactérie par β -oxydation. Leadbetter & Foster (1960) reconnaissent une telle succession de mécanismes si l'attaque enzymatique a lieu

sur le radical primaire, mais montrent la production d'un alcool secondaire puis d'une méthylcétone si l'attaque se fait au niveau du radical secondaire du substrat. Cependant cette dernière oxydation n'apparaît pas comme étant la voie métabolique principale de la plupart des bactéries utilisant ce type d'hydrocarbure comme source de carbone.

Nakajima *et al.* (1974) observent la production de 1-pristanol et d'acide 1-pristanique lors de l'oxydation n-terminale du pristane [] avec la souche *Nocardia* BPM 1613.

Ils font des observations similaires en étudiant l'oxydation par la même souche d'autres hydrocarbures isoprénoïdes (phytane, norpristane, farnesane et 1-pristène) (Nakajima *et al.*, 1985a, 1985b).

Par contre, McKenna & Kallio (1971) observent la formation d'acides dicarboxyliques terminaux lors de l'oxydation du pristane par la souche *Corynebacterium* RTMP-S.

La même observation est faite lors de l'étude de la dégradation du squalène (terpénoïde acyclique) avec *Corynebacterium* sp. (Yamada *et al.*, 1985) (Figure 6).

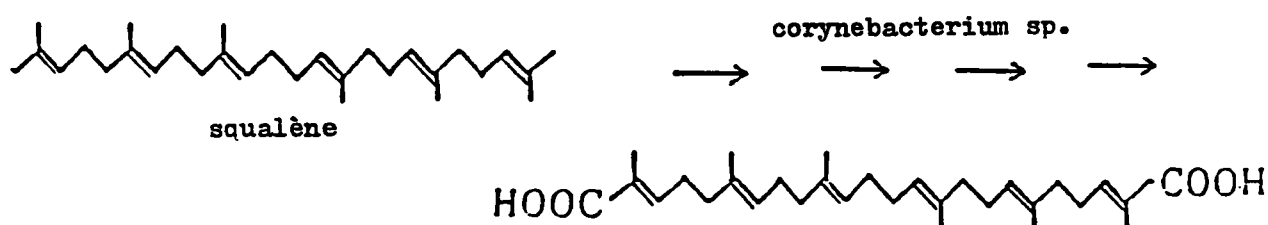
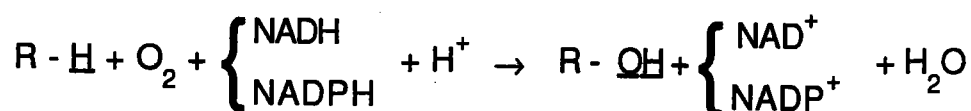


Figure 6 : L'oxydation du squalène par *Corynebacterium* sp. conduit à la formation d'acides dicarboxyliques terminaux.

Les différentes oxydations s'effectuent à partir de l'oxygène de l'air. Ainsi Stewart *et al.* (1959) montrent l'incorporation d'oxygène lourd ($^{18}\text{O}_2$) dans les cellules de *Micrococcus cereficans* après croissance sur hexadécane (C_{16}) utilisé comme seule source de carbone pour produire l'acide carboxylique correspondant : l'acide palmitique.

L'hydroxylase est l'enzyme responsable de la formation des métabolites hydroxylés en présence d'un donneur d'électrons (le plus souvent le pyridine-nucléotide réduit).



Peterson *et al.* (1967) et Peterson & Coon (1968) ont isolé le système enzymatique d'oxydation de *Pseudomonas oleovorans*. L'oxydation se réalise au niveau du groupement méthyl terminal sur le n-octane comme le démontrent Gholson *et al.* (1963).

Chez cette bactérie le système enzymatique se compose de trois protéines : la NADH-Réductase, la Rubredoxine et une hydroxylase (Figure 7).

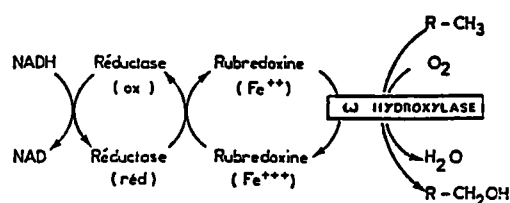


Figure 7 : Système enzymatique d'hydroxylation des alcanes de *Pseudomonas oleovorans*.

Le système hydroxylase de *Pseudomonas oleovorans* n'est pas unique. En effet, chez *Corynebacterium* sp. (souche 7E1C), l'oxydation primaire du n-octane s'effectue comme précédemment par hydroxylation mais la rubredoxine n'est plus impliquée (Cardini & Jurtshuk, 1970) (Figure 8).

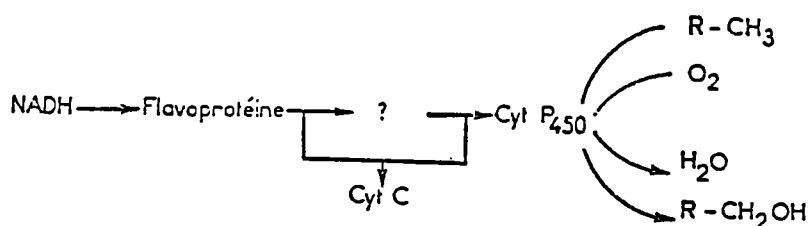


Figure 8 : Système enzymatique d'hydroxylation des alcanes de *Corynebacterium* sp.

L'hydroxylation en alcool primaire d'un alcène terminal nécessite un système enzymatique de formation des époxydes, mécanisme très différent de celui qui catalyse l'oxydation des alcanes (Azoulay, 1966) (Figure 9).

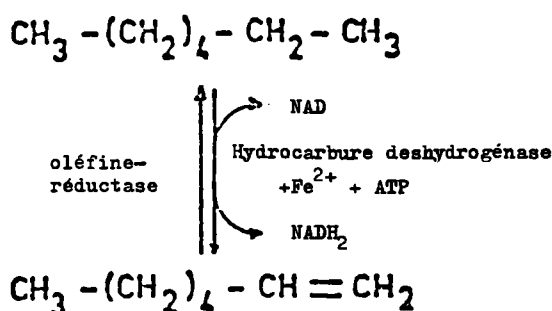


Figure 10 : Le système enzymatique de déshydrogénation de l'alcane par *Pseudomonas aeruginosa* sol 20 forme un équilibre avec le système oléfine-réductase.

2.3.2. METABOLISME DES CYCLOALCANES ET DES CYCLOALCENES

Les cycloalcanes et cycloalcènes sont des composés qui peuvent être totalement dégradés par un nombre de microorganismes très restreint. Cependant deux souches, *Nocardia* sp. (Stirling *et al.*, 1977) et *Pseudomonas* sp. (Anderson *et al.*, 1980), s'avèrent capables d'utiliser le cyclohexane comme source de carbone (Figure 11).

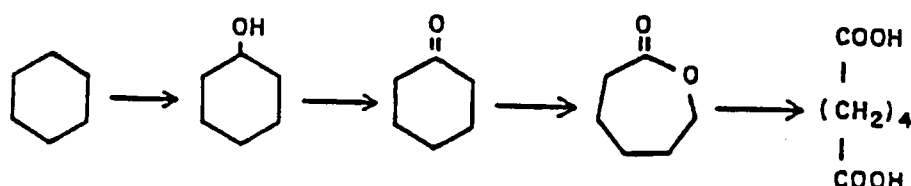


Figure 11 : Mécanisme de dégradation du cyclohexane par une souche de *Nocardia* et de *Pseudomonas*.

Ce mécanisme a été reconstitué par la mise en évidence de trois enzymes : la cyclohexanol déshydrogénase, la cyclohexanone monooxygénase et ϵ -caprolactone hydrolase.

La cyclohexanol déshydrogénase a été purifiée (Stirling & Perry, 1980) et correspond à une alcool secondaire déshydrogénase NAD dépendante.

L'enzyme est spécifique des cycloalcanols substitués ou non (2-méthylcyclohexanol, cyclohexanediol). Quant aux cycloalcènes, leurs mécanismes de dégradation, en particulier la phase d'oxydation, peuvent être affectés par la présence de la double liaison. Ainsi, lors des essais d'oxydation du cyclohexène par *Aspergillus niger* (Bhattacharyya & Ganapathy, 1965), le site d'oxydation préférentiel correspond à un carbone saturé comme le montre la figure 12.

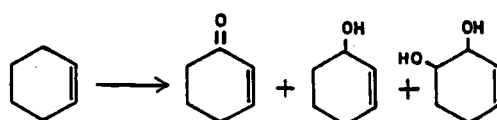


Figure 12 : Oxydation du cyclohexène par *Aspergillus niger*.

La même observation a été rapportée par Ganapathy *et al.* (1966) en étudiant les oxydations du 1-méthyl-1-cyclohexène  et du 1-méthyl-3-cyclohexène  par une souche d'*Aspergillus niger*.

2.3.2.1. Oxydation des cycloalcanes et des cycloalcènes par les bactéries

Si peu de bactéries utilisent les cycloalcanes et les cycloalcènes comme source de carbone, certaines comme *Mycobacterium vaccae* JOB-5 (Ooyama & Foster, 1965) sont capables de les oxyder sans les utiliser comme source de carbone.

Avec *Mycobacterium vaccae* JOB-5, il en résulte une production de composés cétoniques (Figure 13).

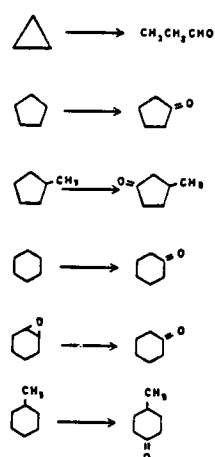
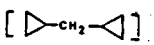


Figure 13 : Oxydation de cycloalcanes par *Mycobacterium vaccae* souche JOB-5.

La figure ci-dessus montre que le cyclopropane, du fait de l'instabilité de sa structure cyclique, est le seul à subir un clivage pour produire un aldéhyde. D'autre part, l'observation montre que les groupements méthyl orientent l'oxydation du substrat, leur oxydation étant plus difficile que celle des carbones formant le cycle.

Chez d'autres bactéries, l'oxydation des cycloalcanes et des cycloalcènes n'aboutit pas à la formation de composés cétoniques, mais à celle de composés hydroxylés. Van Ravenswaay Claasen & Van der Linden (1971) montrent que la souche *Pseudomonas aeruginosa* 473 est capable d'hydroxyler certains cycloalcanes.

Cette enzyme peut aussi hydroxyler le cyclopropane, le dicyclopropylméthane  et le 1,2-dicyclopropyléthane  sans que ceux-ci servent de support à la croissance bactérienne (Van Eyk & Bartels, 1968), car l'hydroxylation des cycloalcanes substitués s'effectue en opposition par rapport au substituant.

Des résultats similaires ont été obtenus par Colby *et al.* (1977) qui ont mis en évidence chez *Methylococcus capsulatus* une enzyme monooxygénase capable d'hydroxyler les cycloalcanes.

2.3.2.2. Dégradation bactérienne des cycloalcanols et cycloalcanones

Les produits d'oxydation des cycloalcanes et des cycloalcènes par certaines bactéries peuvent être utilisés par d'autres bactéries. C'est ainsi que De Klerk & Van der Linden (1974) ont isolé une souche *Pseudomonas* sp. capable d'utiliser comme source de carbone la cyclohexanone.

D'autre part, *Nocardia globerula* souche CL-1 (Norris & Trudgill, 1971) et *Acinetobacter* NCIB 9871 (Donaghue & Trudgill, 1975) sont capables d'utiliser le cyclohexanol comme source de carbone (Figure 14).

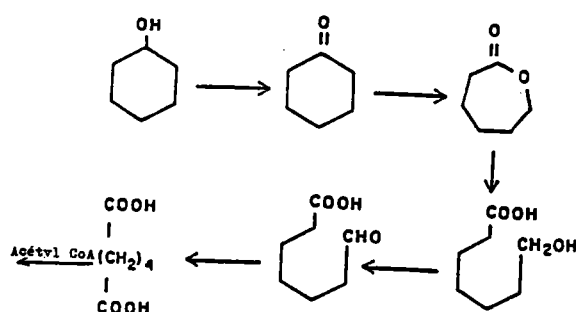


Figure 14 : Voie métabolique de dégradation du cyclohexanol par deux bactéries isolées du sol (*Nocardia globerula* CL-1 et *Acinetobacter* NCIB 9871).

Le mécanisme montre que les cycloalcanones suivent la même voie de dégradation (Trudgill, 1978). La formation d'un intermédiaire de type lactone serait due à l'action d'une flavoprotéine qui a été isolée et purifiée par Griffin & Trudgill (1976) chez *Pseudomonas* NCIB 9872.

Les lactones formées suggèrent que les cycloalcanes sont métabolisés via une réaction d'insertion d'oxygène du type Baeyer-Villiger.

La lactone est une structure instable qui peut s'ouvrir spontanément ou être hydroxylée enzymatiquement pour former un diacide gras assimilable en Acétyl CoA.

2.3.2.3. Dégradation des cycloalcanes et des cycloalcènes alkyl - substitués

Les cycloalcanes et cycloalcènes méthyl- ou éthyl- substitués subissent une oxydation sur le cycle aboutissant à la formation de cycloalcanols ou cycloalcanones substitués.

Cependant, Davis & Raymond (1961) montrent que les souches *Nocardia* 107 - 332 et *Nocardia* M.O sont capables d'oxyder le n-butylcyclohexane [CCCC1CCCCC1] en acides cyclohexanebutyrique [CCCC1CCCCC1C(=O)O] ou cyclohexaneacétique [CC(=O)C1CCCCC1C(=O)O].

Cependant, *Nocardia* 107 - 332 est incapable d'utiliser ces composés comme source de carbone. En effet, son métabolisme ne lui permet d'utiliser que les composés substitués dont la chaîne linéaire possède un nombre impair de carbone.

C'est ainsi que la croissance devient possible avec les acides cyclohexanecarboxylique et cyclohexanepropionique [CCC(=O)C1CCCCC1C(=O)O].

De leur côté, Beam & Perry (1974) ont utilisé des mycobactéries (*M. vaccae*, *M. convolutum*, *M. rhodococcus*) pour étudier la dégradation des cycloalcanes substitués avec de longues chaînes carbonées.

L'oxydation s'effectue sur le méthyl terminal du substituant pour produire un acide carboxylique. L'acide gras formé est incorporé dans les phospholipides cellulaires ou dégradé en acétyl CoA par le mécanisme de la β -oxydation.

De par leur structure, il semble normal que ces composés aient des mécanismes de dégradation similaires à ceux des alcanes.

Les cycloalcanes et les cycloalcènes polysubstitués peuvent aussi être utilisés comme source de carbone par les bactéries. Par exemple, le p-menthane [CC1(C)CCCC(C1)C] est hydroxylé par *Pseudomonas mendocina* souche SF grâce à une enzyme monooxygénase (Figure 15) (Tsukamoto *et al.*, 1975, 1977).

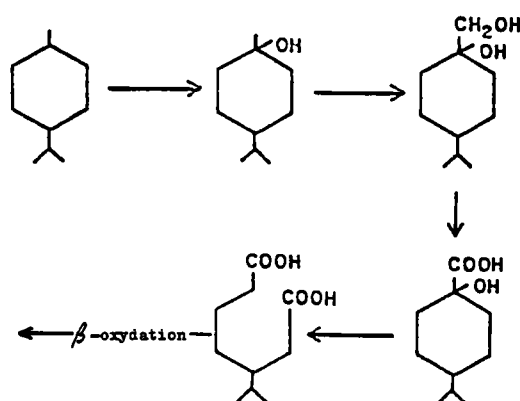


Figure 15 : Biodégradation de p-menthane par *Pseudomonas mendocina* souche SF.

De même *Pseudomonas* souche PL est capable de croître avec α -pinène [CC1=CCC(CC1)C], β -pinène [CC1=CC=CCC1], limonène [CC1=CCC(CC1)C] comme seule source de carbone (Shukla & Bhattacharyya, 1968 ; Shukla *et al.*, 1968). De plus, Pujar & Bhattacharyya (1973a, 1973b) montrent que cette même souche est capable de croître sur 1-p-menthène [CC1=CCCC(C1)C] et 3-p-menthène [CC1=CC(C)CCC1].

2.3.2.4. Dégradation des acides naphténiques

Deux types de dégradation ont été rapportés dans la littérature :

- d'une part, la biotransformation de l'acide cyclohexanecarboxylique par la bactérie PRLW19 met en jeu un mécanisme de β -oxydation similaire à celui des acides gras via une α -oxydation de l'ester cyclohexanecarboxyl-CoA (Figure 16) (Blakley, 1978).

2.3.3. METABOLISME DES HYDROCARBURES AROMATIQUES

2.3.3.1. Le benzène

Les premières investigations menées sur le benzène avec *Pseudomonas putida* par Gibson et al. (1968 & 1970) ont permis de mettre définitivement en évidence la formation de cis-benzène dihydrodiol avec deux atomes d'oxygène dérivant de l'oxygène moléculaire. Ce mécanisme est différent du métabolisme de dégradation du benzène chez les levures et les mammifères pour lequel il y a production de trans-benzène dihydrodiol par hydratation de l'époxyde de benzène (Figure 18).

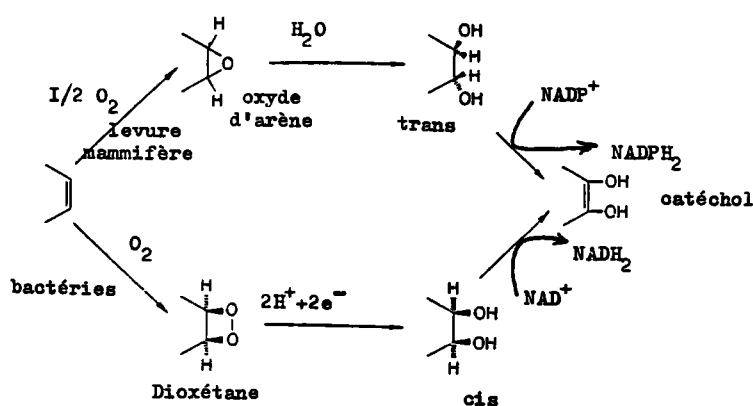


Figure 18 : Voies métaboliques générales menant au catéchol chez les hydrocarbures aromatiques par les organismes eucaryotes et procaryotes. (L'intermédiaire dioxétane n'a jamais été formellement mis en évidence).

Le mécanisme de dégradation du benzène par *Pseudomonas putida* (Figure 20) a été compris à partir des observations suivantes :

1. Après croissance sur un hydrocarbure aromatique approprié, les suspensions cellulaires oxydent le benzène en cis-benzène diol et catéchol et non pas en phénol et trans-benzène diol. De plus, les sources de carbone sont faiblement oxydées par des cellules croissant en absence d'hydrocarbure.

2. Les relations stoechiométriques de consommation d'oxygène lors de l'oxydation du benzène montrent que 2, 1,5 et 1 moles d'oxygène sont utilisées pour le benzène, le cis-benzène dihydrodiol et le catéchol respectivement.

3. L'extrait cellulaire enrichi en Fe^{2+} (donneur d'électrons) cystéine, éthanol et NAD, catalyse l'oxydation du benzène. Le cis-benzène-dihydrodiol, le catéchol et l'acide α -hydroxymuconique semi-aldéhyde sont formés à chaque fois.

4. Les expériences isotopiques montrent que le ^{14}C -benzène peut être oxydé par les suspensions cellulaires. Le trans-diol n'a jamais été observé.

5. *Pseudomonas putida* souche 39/D, incapable de croître avec les hydrocarbures aromatiques comme seule source de carbone, accumule un benzène dihydrodiol remarquablement identique au cis-benzène dihydrodiol de synthèse. Une enzyme déhydrogénase NAD dépendante pour le cis-benzène dihydrodiol a été mise en évidence.

Trois protéines différentes A_1 , A_2 , et B, séparées par chromatographie d'extraits cellulaires de *Pseudomonas putida* sur DEAE-cellulose (Axccl & Geary, 1975) en présence de NADH et d'ions ferreux participent au transport d'électrons permettant l'oxydation du benzène en cis-benzène dihydrodiol (Figure 19).

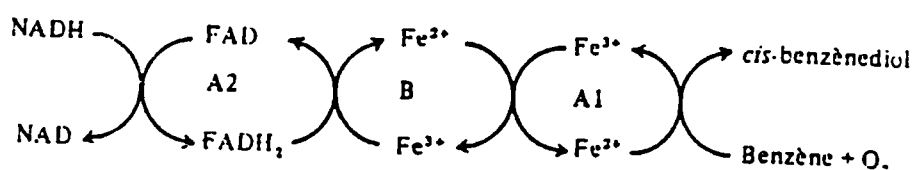


Figure 19 : Schéma d'oxydation du benzène chez *Pseudomonas putida*.

La fixation de l'oxygène moléculaire sur le benzène est accomplie par l'enzyme oxygénase A_1 .

La cis-benzène dihydrodiol déhydrogénase permettant la production du catéchol, a été purifiée par Axccl & Geary (1973) sur la même souche de *Pseudomonas putida*. Cette enzyme est spécifique au cis-diol et nécessite le cofacteur NAD. Il s'agit d'une tétramère de poids moléculaire 110 000 dont les quatre sous-unités sont similaires.

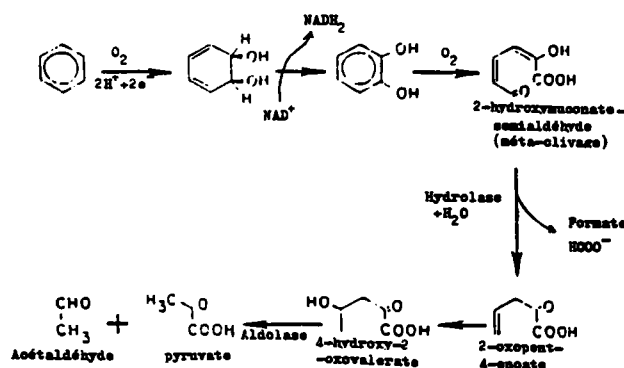


Figure 20 : Schéma de dégradation du benzène par *Pseudomonas putida*.

Le mécanisme d'assimilation du benzène est en deux étapes. Dans un premier temps le cycle aromatique est oxydé en catéchol, puis dans un deuxième temps le cycle est rompu (méta-clivage) par une oxygénase avant d'être assimilé sous forme de pyruvate ou d'acétaldéhyde par la bactérie.

Dagley & Gibson (1965) observent le même métabolisme de dégradation avec deux souches de *Pseudomonas* et le catéchol comme seule source de carbone.

Par contre, si le métabolisme de dégradation du benzène par *Moraxella* sp. mène bien au catéchol, Högn & Jaenicke (1972) observent un mécanisme de dégradation du catéchol aboutissant à la formation d'acide cis, cis-muconique par ortho-clivage assimilable sous forme de succinate et d'acétyl CoA par la bactérie (Figure 21).

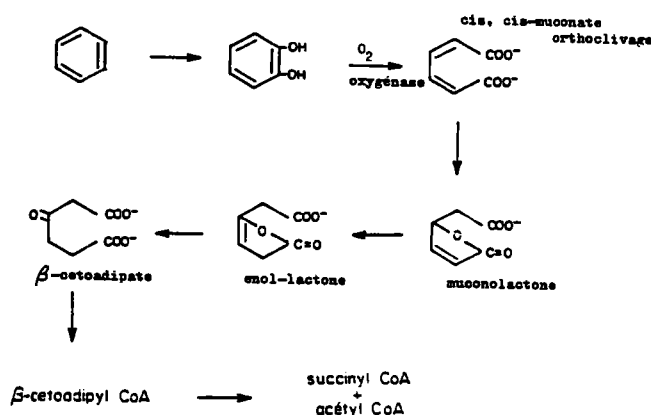


Figure 21 : Schéma de dégradation du benzène par *Moraxella* sp.

En plus des deux voies de dégradation (ortho et méta clivage) (Figures 20 et 21) une troisième voie a été observée chez certaines bactéries qui sont incapables d'hydrolyser le métabolite 2-hydroxymuconatesemialdéhyde en 2-oxopent-4-énoate après méta-clivage et qui pourtant, produisent l'acide pyruvique et l'acétaldéhyde.

Cette voie plus complexe a été observée chez *Azotobacter* (Sala - Trepas & Evans, 1971) et passe par la production de l'acide 4-oxalocrotonique (Figure 22).

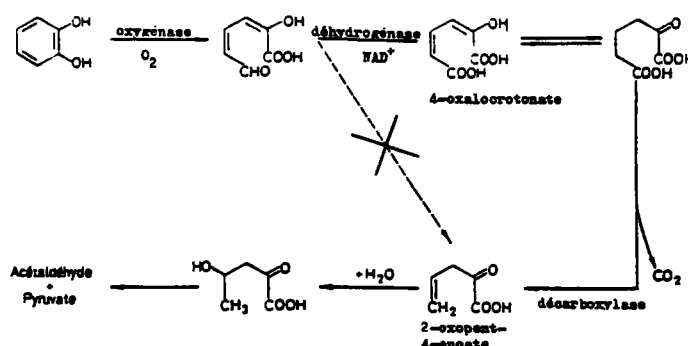


Figure 22 : Mécanisme de production de l'acide 4-oxalocrotonique lors de l'oxydation du catéchol par *Azotobacter*.

Ce mécanisme conduit à la formation des mêmes métabolites que ceux obtenus lors du mécanisme de méta-clivage (Figure 20).

Pour pallier une déficience enzymatique la bactérie passe par la production de deux métabolites supplémentaires pour aboutir à la production du 2-oxopent-4-énoate.

2.3.3.2. Les monoalkylbenzènes

Pseudomonas putida (Gibson *et al.*, 1968) est capable de croître avec comme seule source de carbone le toluène ou l'éthylbenzène ou l'isopropylbenzène ou le propylbenzène ou encore le butylbenzène suivant le mécanisme général présenté sur la figure 23.

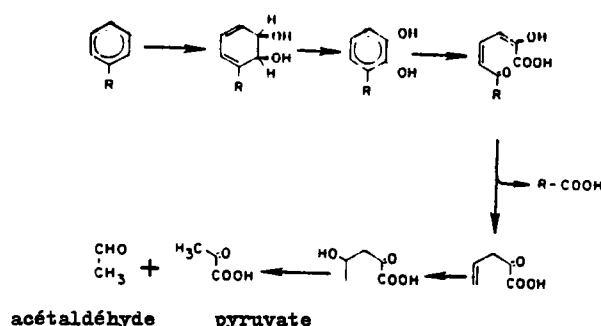


Figure 23 : Schéma général de la dégradation des monoalkylbenzènes par *Pseudomonas putida*.

Le mécanisme de dégradation correspond dans un premier temps à l'oxydation du cycle aromatique pour produire un catéchol monosubstitué. Le cycle aromatique subit ensuite un méta-clivage qui aboutit à la production d'un acide gras qui peut être assimilé par la bactérie, par le mécanisme de la β -oxydation.

Cependant, les substituants des monoalkylbenzènes ne sont pas à l'abri de l'oxydation bactérienne. Mais les transformations métaboliques des substituants sont souvent secondaires à l'ouverture du cycle, comme le montre l'exemple de la dégradation de l'éthylbenzène par *Pseudomonas putida* (Figure 24).

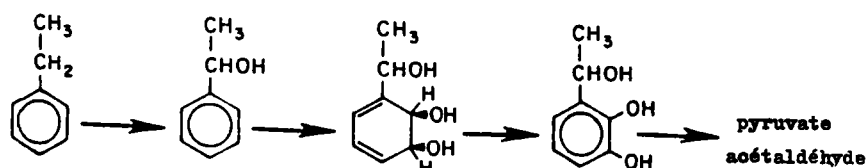


Figure 24 : Transformation métabolique mineure de l'éthylbenzène par *Pseudomonas putida*.

Pourtant, il s'agit parfois de la seule voie que peut emprunter la bactérie, pour utiliser l'hydrocarbure comme source de carbone. C'est ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* oxyde le toluène en benzylalcool, en benzaldéhyde et en benzoate avant d'induire le catéchol, comme le montre la figure 25 (Ribbons & Eaton, 1982).

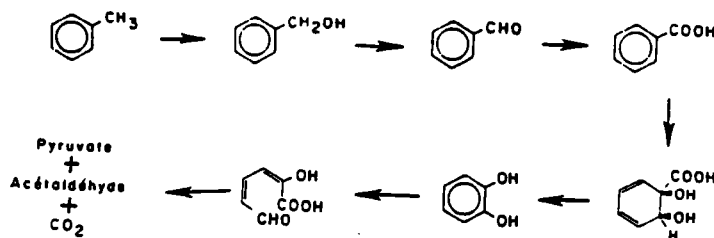


Figure 25 : Transformation métabolique du toluène par *Pseudomonas aeruginosa*.

La dégradation du toluène par *Pseudomonas aeruginosa* passe par l'intermédiaire benzoate. Il est important de signaler que certaines bactéries ne dégradent pas le benzoate en catéchol. En effet, Hutber & Ribbons (1983) ont observé une déaromatation du benzoate pour permettre à *Rhodopseudomonas palustris* de l'assimiler suivant le mécanisme de la β -oxydation, que cela soit en aérobie ou en anaérobie (Figure 26).

Selon Neilson *et al.* (1985), ce mécanisme se rencontre le plus souvent en anaérobie.

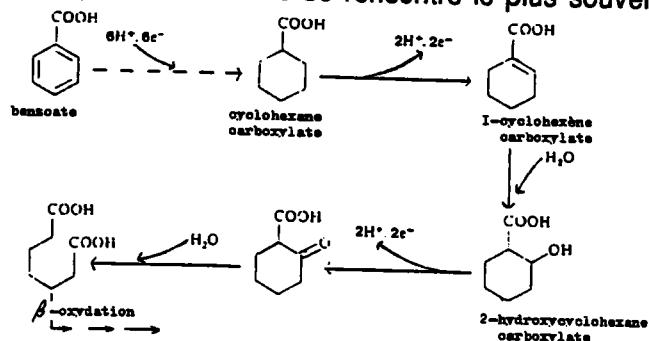


Figure 26 : Métabolisme de dégradation du benzoate par *Rhodopseudomonas palustris*.

La perte d'aromaticité du cycle n'est pas un phénomène unique puisque *Pseudomonas convexa* peut dégrader l' α -méthylstyrène en ayant comme intermédiaire non aromatique le cis-2,3-dihydroxy-1-isopropényl-6-cyclohexène (Figure 27) (Ribbons & Eaton, 1982).

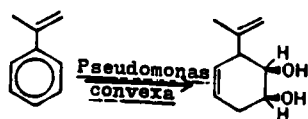


Figure 27 : Perte de l'aromaticité lors de la dégradation de l' α -méthylstyrène par *Pseudomonas convexa*.

Pseudomonas desmolytica S339B1 est capable aussi de produire un intermédiaire saturé lors de la dégradation de l'éthyl-, propyl- et n-butylbenzène (Figure 28) (Ribbons & Eaton, 1982).

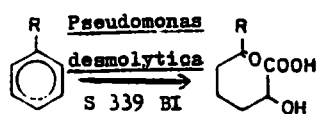


Figure 28 : Production d'un métabolite saturé lors de la biotransformation par *Pseudomonas desmolytica* S330B1 de 3 monoalkylbenzène R = éthyl, propyl, n-butyl.

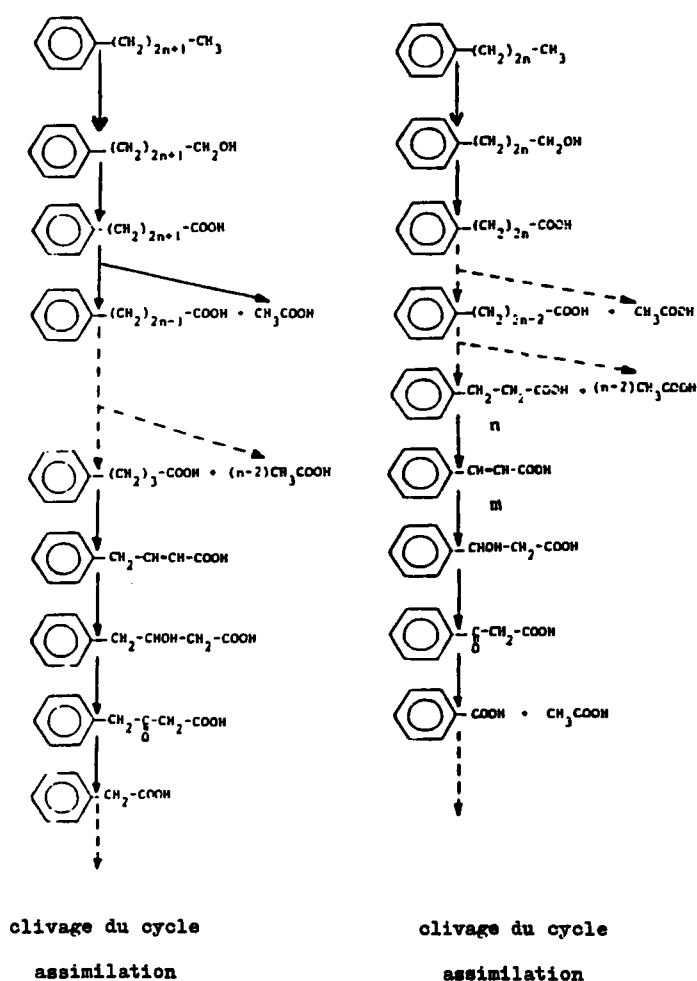


Figure 29 : Assimilation des monoalkylbenzènes à longue chaîne carbonée : les chaînes ayant un nombre pair de carbone aboutissent à la production d'acide phénylacétique, un nombre impair à l'acide benzoïque.

La dégradation des monoalkylbenzènes à longue chaîne (≥ 5 carbones) présente des similitudes avec celle des cycloalcanes monosubstitués du même type (chapitre 2.3.2.3.). Le cycle aromatique n'est pas oxydé mais, par contre, le substituant carboné est fragmenté par β -oxydation et supporte la croissance bactérienne (Ribbons & Eaton, 1982). L'acide benzoïque ou l'acide phénylacétique formés (Figure 29) sont ensuite assimilés par les bactéries (Rontani *et al.*, 1985).

Yamada *et al.* (1985) ont étudié le même mécanisme de β -oxydation lors de la dégradation par *Corynebacterium* sp. de deux terpénoïdes : le farnesylbenzyléther et le géranylbenzyléther (Figure 30).

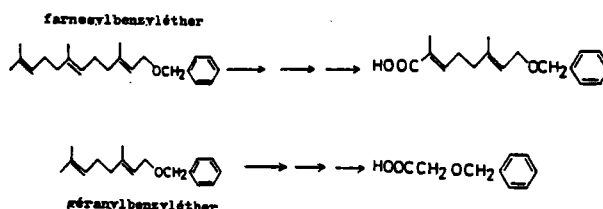


Figure 30 : Dégradation par β -oxydation de deux terpénoïdes par *Corynebacterium* sp.

2.3.3.3. Les dialkylbenzènes

Les composés aromatiques diméthylsubstitués comme le m-xylène et p-xylène ont été largement étudiés. De nombreux métabolites de dégradation carboxylés et hydroxylés ont alors été isolés (Ribbons & Eaton, 1982) (Figure 31).

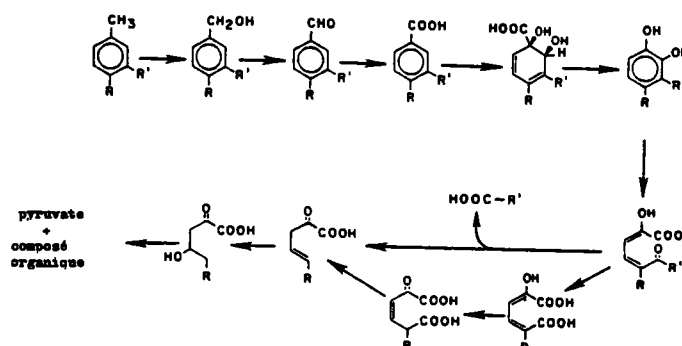


Figure 31 : Schéma de dégradation général par la bactérie *Pseudomonas putida*



La dégradation de ces composés débute par l'oxydation d'un des substituants pour former un acide benzoïque substitué.

Après oxydation en diol du cycle aromatique, celui-ci est rompu par méta-clivage avant d'être assimilé sous forme de pyruvate par la bactérie.

En raison de la grande similitude de structure entre terpènes, paraalkyltoluènes et paraaryltoiluènes, les travaux effectués avec la même souche bactérienne (*Pseudomonas* souche PL) que celle utilisée par Shukla & Bhattacharyya (1968) et Shukla *et al.* (1968) pour l'étude de la dégradation de terpènes, ont permis d'établir le mécanisme de dégradation présenté sur la figure 32 (Ribbons & Eaton, 1982).

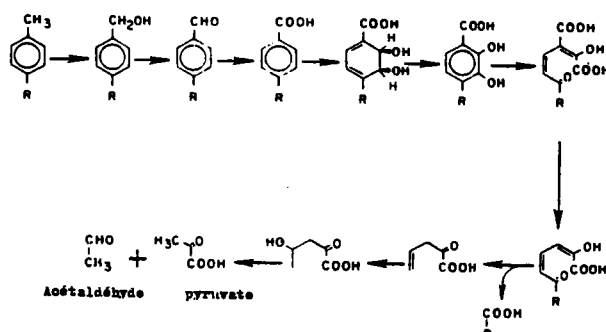


Figure 32 : Schéma général de dégradation par *Pseudomonas* souche PL.

du paraxylène	R = CH ₃	du parabutyltoluène	R = C ₄ H ₉
du paraéthyltoluène	R = C ₂ H ₅		
du parapropyltoluène	R = C ₃ H ₇	du paraisobutyltoluène	R = $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
du paraisopropyltoluène	R = CH-CH ₃ CH ₃	et du 4-méthylbiphényl	R = $\bigcirc$

La dégradation de ces composés débute par l'oxydation du substituant méthyl pour former un acide benzoïque substitué. Après oxydation en diol du cycle aromatique, celui-ci est rompu par méta-clivage, avant d'être assimilé sous forme de pyruvate par la bactérie. Quant au second substituant, après son oxydation en acide gras, il est assimilé par β -oxydation.

2.3.3.4. Les composés naphthaléniques

Le mécanisme de dégradation du naphthalène par diverses *Pseudomonas* est actuellement bien établi (Davies & Evans, 1964), (Barnsley, 1976), (Ribbons & Eaton, 1982), (Cerniglia, 1984a, 1984b) (Figure 33).

Après oxydation d'un des cycles aromatiques pour former un diol, celui-ci est rompu suivant la voie de méta-clivage afin de réduire la chaîne carbonée en pyruvate assimilable et de produire le catéchol qui sera lui-même éliminé sous forme de pyruvate et d'acétaldéhyde.

Davies & Evans (1964) montrent que le mécanisme peut être plus complexe et mettent en évidence plusieurs formes du cis-o-hydroxybenzalpyruvate chez *Pseudomonas* (Figure 34).

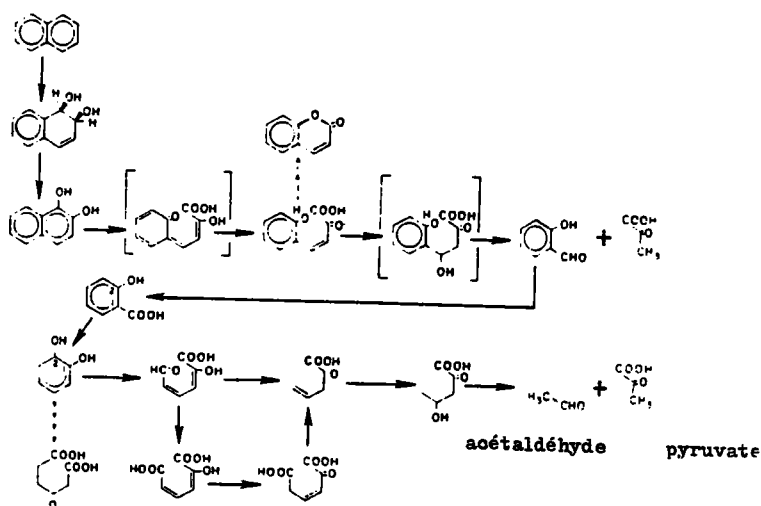


Figure 33 : Schéma de dégradation du naphthalène par *Pseudomonas*.

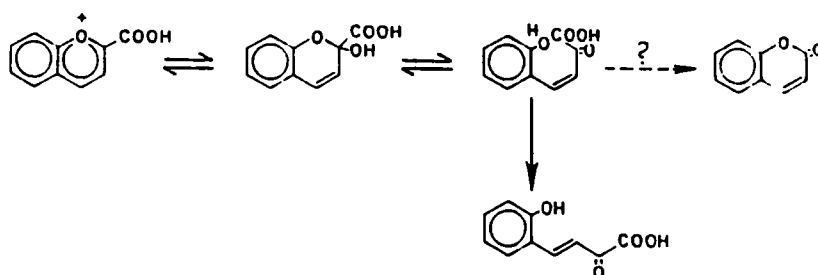


Figure 34 : L'oxydation de 1,2-hydroxynaphtalène aboutit à la formation du cis-o-hydroxybenzalpyruvate qui peut prendre plusieurs formes structurales.

Ribbons & Eaton (1982) montrent l'existence de certaines souches de *Pseudomonas* qui utilisent le mécanisme de dégradation passant par l'intermédiaire de l'acide 4-oxalocrotonate pour aboutir au pyruvate et à l'acétaldéhyde (cf. 2.3.3.1.). Quant à Barnsley (1976), il a isolé des souches qui dégradent le catéchol en cis, cis-muconate pour aboutir à la production d'acétyl CoA et de succinate. Cerniglia (1984c) indique que *Bacillus cereus* produit le 1-naphtol à partir du naphthalène. Cette observation est remarquable puisque la monooxydation n'était observée jusqu'alors que chez les eucaryotes (Gibson, 1971) (Figure 35).

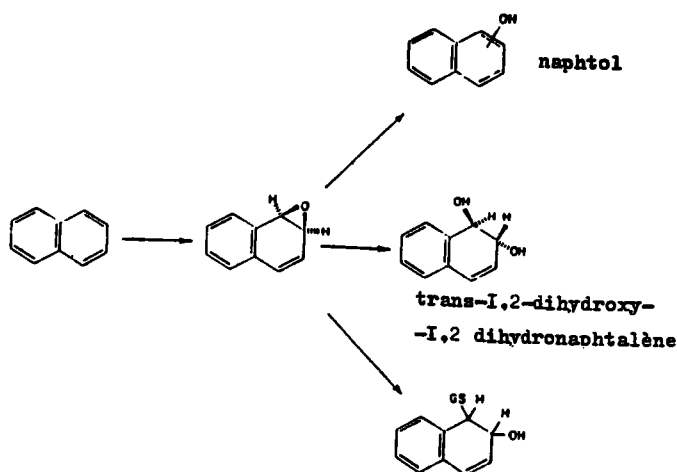


Figure 35 : Métabolisme de dégradation du naphthalène chez les eucaryotes.

Du point de vue enzymatique, Griffiths & Evans (1965) ont montré que chez *Pseudomonas*, un seul système enzymatique était nécessaire pour transformer le naphthalène en acide cis-o-hydroxybenzalpyruvate (Figure 36). Il s'agirait d'un système enzymatique perhydroxylase NADH dépendant, constitué de 3 ou 4 enzymes associés.

Ce système semble actif sur le toluène, le phénanthrène et l'anthracène.

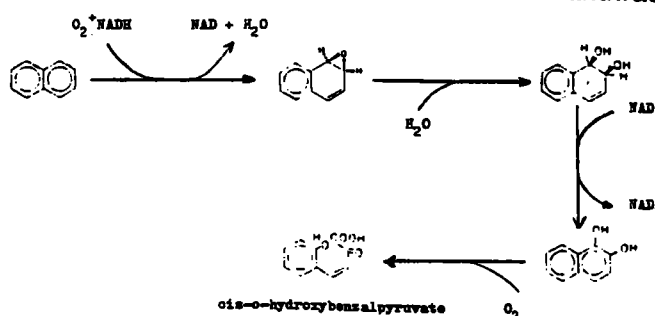


Figure 36 : La formation du cis-o-hydroxybenzalpyruvate, à partir du naphthalène, serait dû à un seul système enzymatique NAD dépendant.

Les composés naphthaléniques alkylsubstitués sont peu étudiés. Ribbons & Eaton (1982) ont proposé un mécanisme général, obtenu à partir des études faites avec *Pseudomonas*, de la dégradation du 1-méthyl-naphthalène et du 2-méthyl-naphthalène (Figure 37) et celui du carbaryl par deux souches de *Pseudomonas* sp. et par *Rhodococcus* sp. (Figure 38).

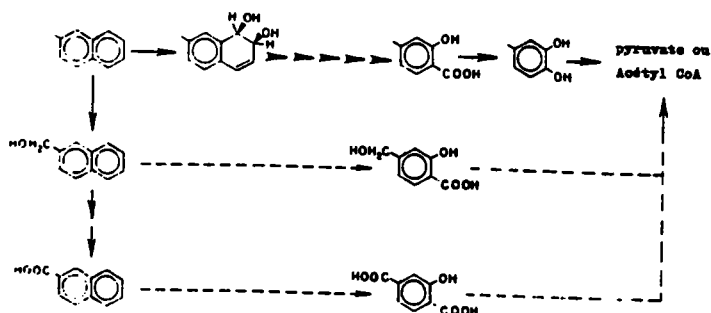


Figure 37 : Mécanisme de dégradation du 2-méthyl-naphthalène par différentes souches de *Pseudomonas*.

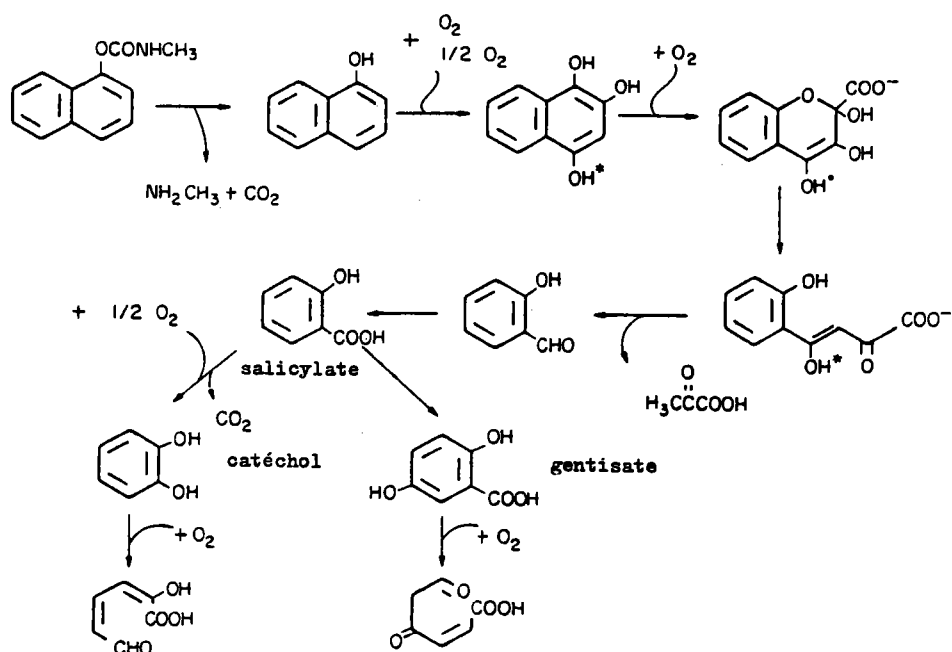


Figure 38 : Mécanisme de dégradation du carbaryl par deux souches *Pseudomonas* sp. et une souche *Rhodococcus* sp. (*) indique la présence d'un groupement hydroxy correspondant à la position 1 du 1-naphtol si celui-ci est hydroxylé par l'enzyme catéchol -3,4-oxygénase.

Le mécanisme de dégradation du carbaryl est identique à celui de l' α -naphtol (ou encore du naphthalène) pour aboutir à l'acide pyruvique et à l'acétaldéhyde avec la souche *Pseudomonas* sp. NCIB 12042.

Par contre, les deux autres souches transforment le salicylate en gentisate.

Ce mécanisme, observé lors de la dégradation de l'acide méta-hydroxybenzoïque par *Pseudomonas ovalis* S-5 (Sugiyama et al., 1958), semble dépendre non pas de la richesse enzymatique des bactéries étudiées, mais plutôt de la source de carbone (dans notre cas le Carbaryl) qui induit le mécanisme.

En effet, ce cas n'a jamais été rencontré avec le naphthalène comme source de carbone, malgré la formation de salicylate comme intermédiaire identique à la dégradation du carbaryl.

2.3.3.5. Les composés phénanthréniques et anthracéniques

Le métabolisme de dégradation du phénanthrène a été établi par Evans *et al.* (1965) avec *Pseudomonas aeruginosa* et par Kiyohara *et al.* (1976) avec *Aeromonas* sp. (Figure 39).

La dégradation du phénanthrène est similaire à celle du benzène et du naphthalène (oxydation en diol, clivage des cycles aromatiques) et peut mener à la formation du protocatéchuate [].

Les mécanismes de dégradation du protocatéchuate ont été largement étudiés (Ornston & Yeh, 1982) (Durham, 1984) (Durham *et al.*, 1984).

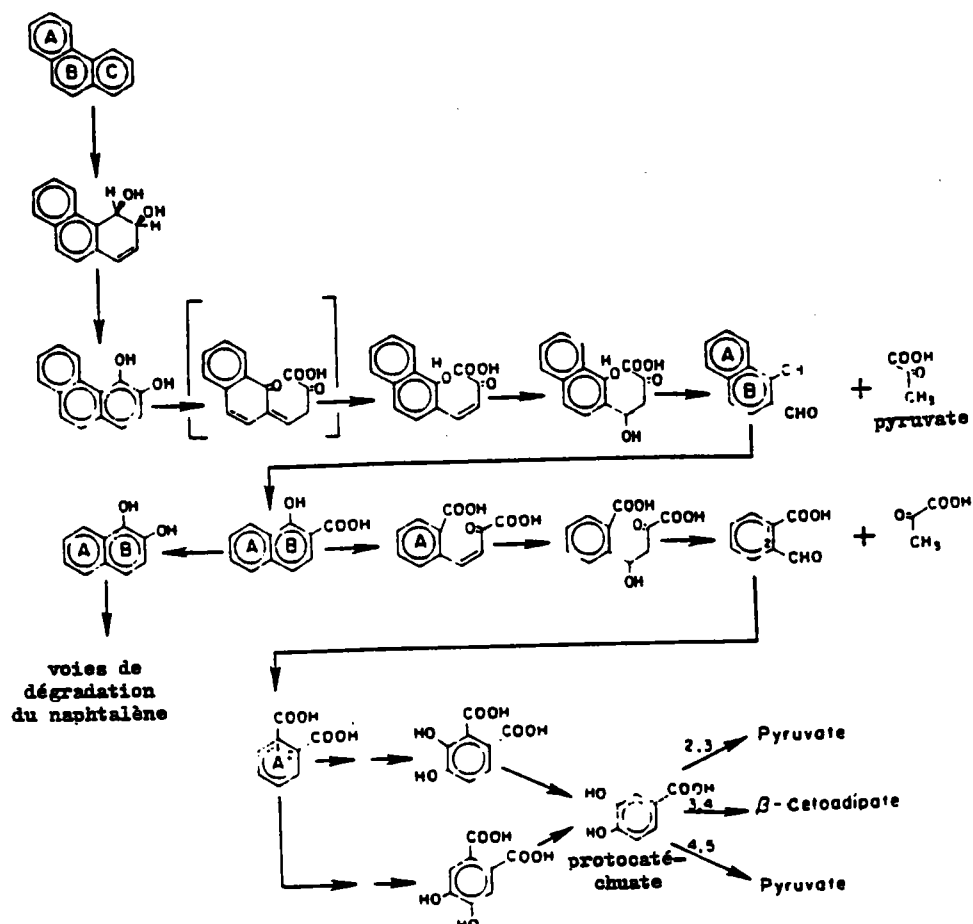


Figure 39 : Mécanisme de dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas aeruginosa* et par *Aeromonas* sp.

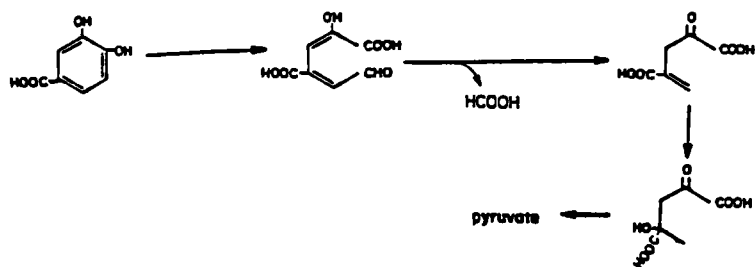


Figure 40 : Mécanisme de dégradation du protocatéchuate aboutissant à la production de pyruvate.

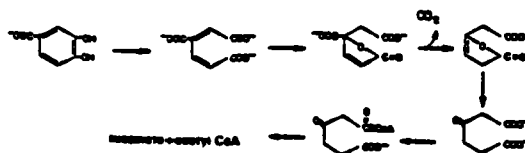


Figure 41 : Mécanisme de dégradation du protocatéchuate aboutissant à la production d'acétyl CoA et de succinate.

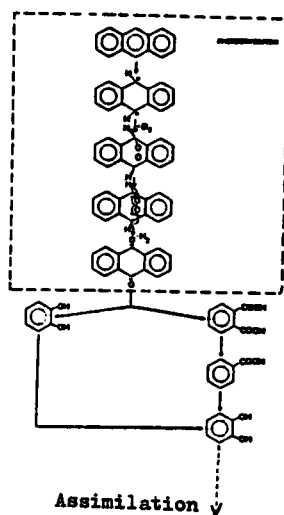


Figure 43 : Mécanisme de dégradation de l'anthracène par photooxydation et à l'aide de bactéries marines.

L'activité des levures sur le phénanthrène et sur l'anthracène aboutit à la formation de trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydroanthracène et de 1-anthrylsulfate (Figure 44) avec la levure *Cunninghamella elegans* (Cerniglia, 1984a).

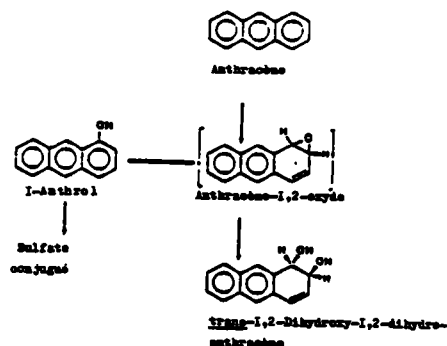


Figure 44 : Mécanisme d'oxydation de l'anthracène par *Cunninghamella elegans* (l'époxyde n'a pas été identifié avec certitude).

Quant à l'oxydation du phénanthrène par la même levure (Cerniglia & Yang, 1984), elle mène à la formation des trans-1,2- et trans-3,4-dihydrodiols (Figure 45).

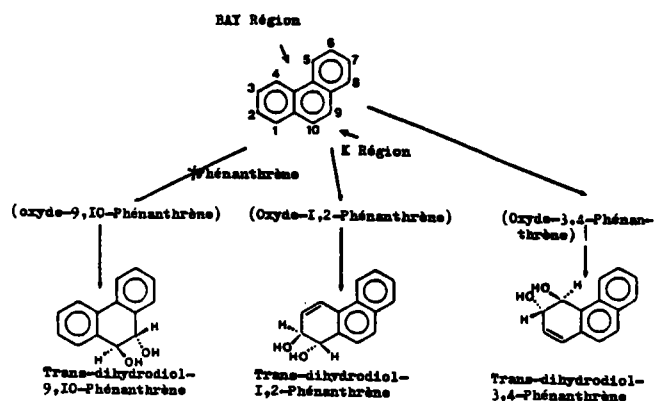


Figure 45 : Réaction d'hydroxylation du phénanthrène par la levure *Cunninghamella elegans*.

A l'inverse des mammifères, la levure *Cunninghamella* est incapable d'oxyder le phénanthrène en trans-9,10-dihydrodiol (K-région).

2.3.3.6. Les hydrocarbures à 4 (ou plus) cycles aromatiques

Le benz[a] anthracène (Cerniglia, 1984a), le 7,12-diméthyl benz[a] anthracène (Wu & Wong, 1981), le 3-méthylcholanthrène (Cerniglia, 1984a) et le benzo[a] pyrène (Barnsley, 1975 ; Gibson *et al.*, 1975 ; Cerniglia, 1984a) sont les seuls hydrocarbures à quatre (ou plus) cycles aromatiques dont l'oxydation bactérienne a été étudiée.

Par rapport au phénanthrène et à l'anthracène, peu de métabolites ont été mis en évidence si ce n'est différents dihydrodiols (Figures 46 et 47).

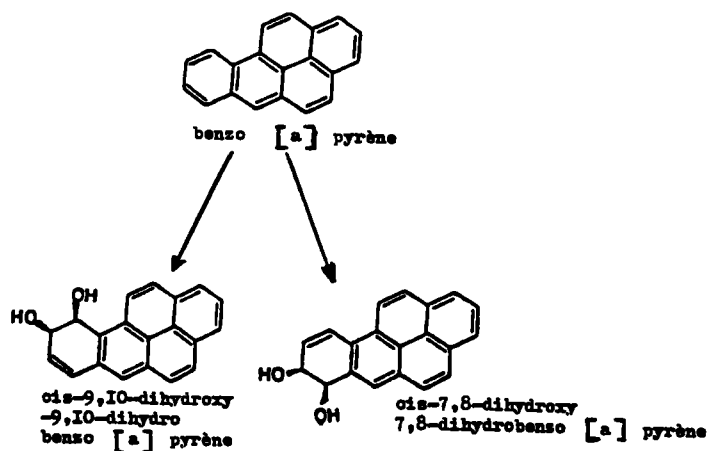


Figure 46 : Réaction d'oxydation du benzo[a] pyrène par *Beijerinckia* sp. B-836 (Gibson *et al.*, 1975).

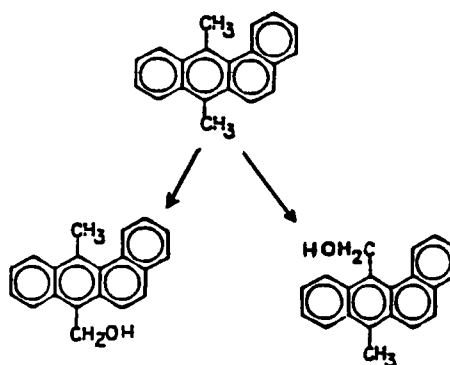


Figure 47 : Réaction d'oxydation du 7,12-diméthylbenz[a] anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* et *Penicillium notatum* (Wu & Wong, 1981).

Du fait de leur carcinogénéité, les mécanismes d'oxydation de ces molécules par les eucaryotes sont mieux connus (Cerniglia, 1984b).

L'activité monooxygénasique conduit généralement, chez les levures, à la formation de quinones, de composés mono-hydroxylés et de trans-dihydrodiols (Figure 48).

Chez les mammifères, les mécanismes d'oxydation sont encore plus complexes et conduisent à la formation de composés carcinogènes, mutagènes, cytotoxiques et chimiquement réactifs avec l'ADN (Figure 49).

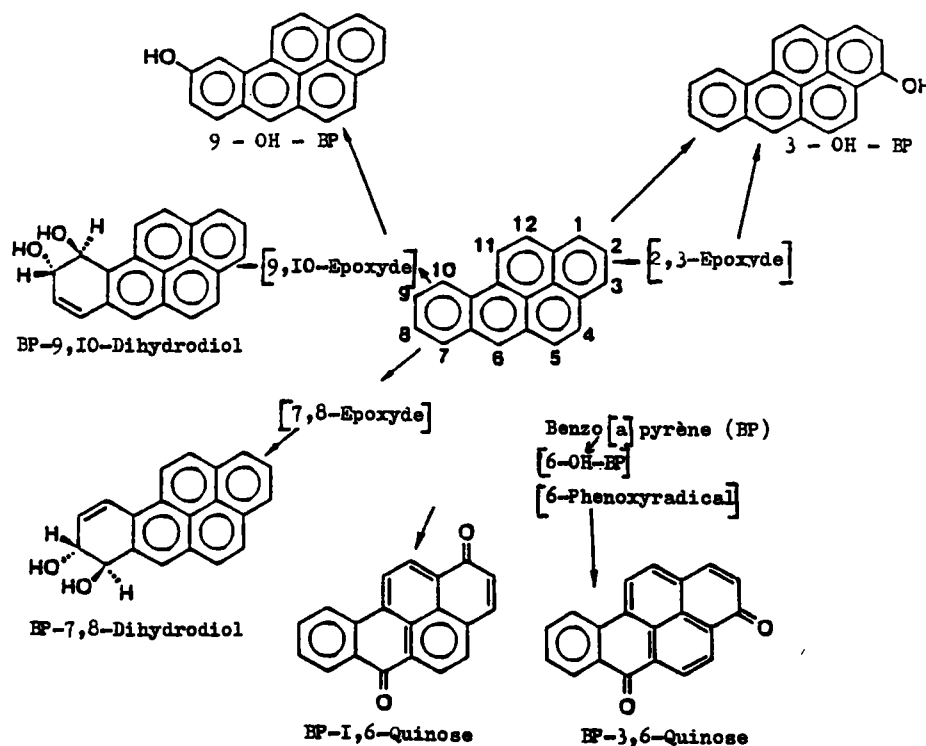


Figure 48 : Voies d'oxydation du benzo[a] pyrène par *Cunninghamella elegans* (Cerniglia, 1984b).

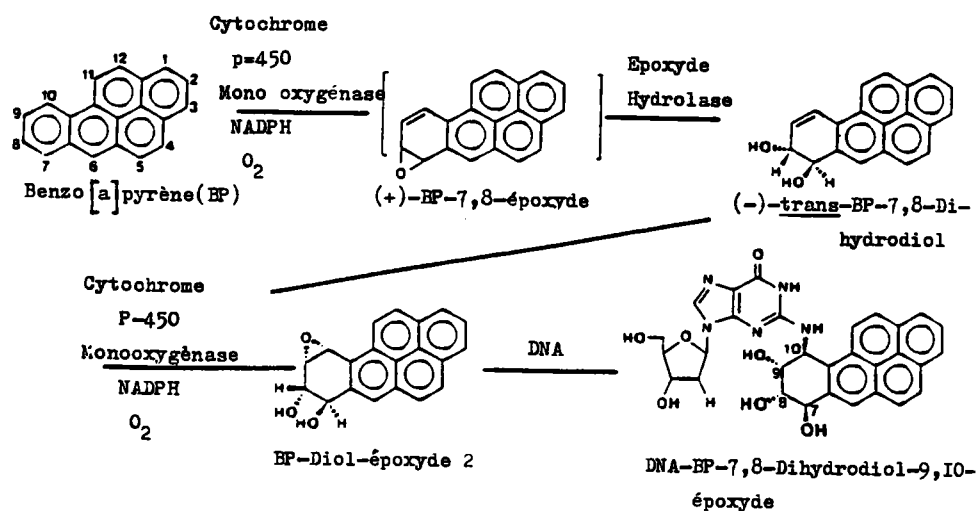


Figure 49 : Activation métabolique du benzo[a] pyrène chez les mammifères (Cerniglia, 1984b).

2.3.3.7. Les composés phénoliques

Nombreux sont les auteurs qui ont étudié la dégradation du phénol (Evans, 1947 ; Feist & Hegeman, 1969 ; Bayly & Wigmore, 1973 ; Molin & Nilsson, 1985).

Quant à Bettman & Rehm (1984), ils étudient la dégradation de cette source de carbone avec *Pseudomonas* sp. adsorbé sur de l'alginate et sur de l'hydrazine polyacrylamide.

Le mécanisme de dégradation du phénol est schématisé sur la figure 50.

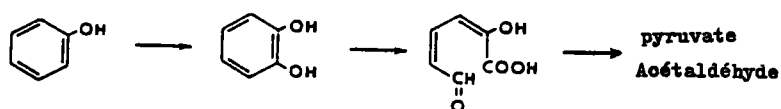


Figure 50 : Mécanisme de dégradation du phénol par *Pseudomonas putida*.

Le mécanisme de dégradation du phénol est simple ; il nécessite une enzyme hydroxylase qui produit le catéchol, celui-ci étant ensuite normalement assimilé par la bactérie en pyruvate.

Après avoir montré que les métabolismes de l'acide benzoïque et du phénol par *Pseudomonas putida* passent par la formation du catéchol, Feist & Hegeman (1969) montrent que l'assimilation de ce dernier aboutit à la production de pyruvate, tandis que pour l'acide benzoïque, il y a production d'acétyl CoA et de succinate et ceci pour la même bactérie.

Ils en déduisent que, si la capacité de la bactérie à produire l'acétyl CoA et le succinate dépend bien de sa capacité d'assimilation du cis, cis-muconate (ortho-clivage du catéchol), la capacité à produire le pyruvate semble induite spécifiquement par le substrat primaire qui, dans notre cas, est le phénol.

Pitter (1984 et 1985) étudie le taux de dégradation des composés phénoliques monosubstitués en ortho, méta ou para avec une culture bactérienne hétérogène provenant des boues activées d'une station de traitement des eaux usées.

Il établit ainsi une relation linéaire entre le logarithme du taux spécifique de dégradation v (mg/g/h) du composé phénolique monosubstitué (- COO⁻, - CH₃, - OH, - Cl, NO₂, - NH₂) en ortho, puis en méta et enfin en para et σ la constante dépendant des caractéristiques électroniques des différents substituants en ortho (σ_o), en méta (σ_m) et en para (σ_p).

$$\log v = \rho \sigma + \log v_o$$

v_o étant le taux spécifique de dégradation du phénol et ρ la pente des courbes obtenues (Figure 51).

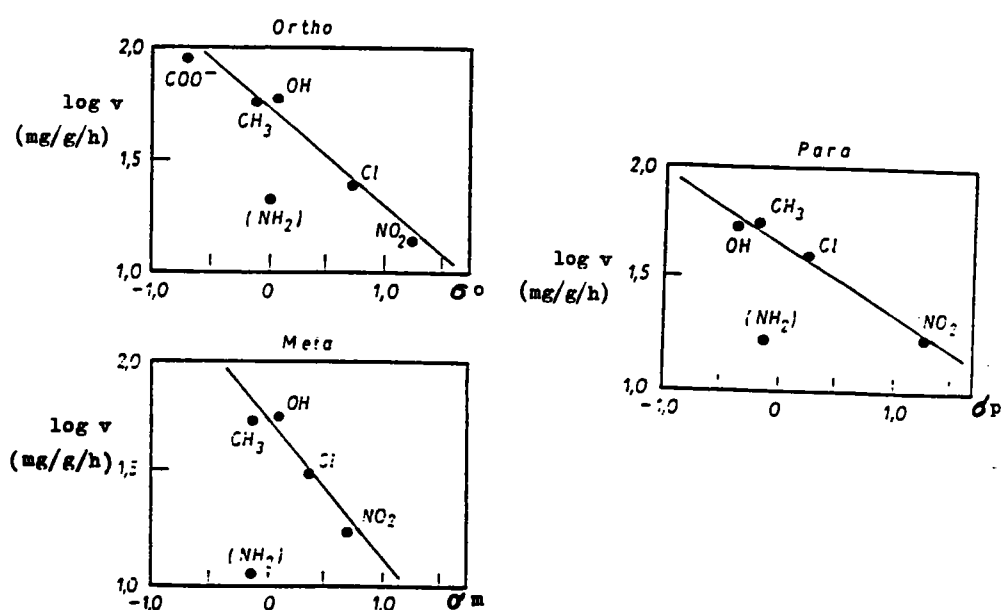


Figure 51 : Représentations graphiques obtenues après modélisation des résultats de l'étude de la dégradation des composés phénoliques monosubstitués (R = COO⁻, - CH₃, - OH, - NH₂, - Cl et - NO₂) en ortho, méta et para.

Pitter (1984 et 1985) établit ainsi trois équations linéaires :

$\log v = -0,43 + 1,7 (r = 0,98)$ pour les composés phénoliques orthosubstitués,

$\log v = -0,616 + 1,72 (r = 0,4)$ pour les composés phénoliques métasubstitués,

$\log v = -0,323 + 1,65 (r = 0,99)$ pour les composés phénoliques parasubstitués.

Mais l'auteur n'a pas tenu compte dans ses calculs des composés phénoliques substitués avec $-NH_2$, les valeurs s'éloignant fortement des résultats obtenus avec les autres molécules.

De ces résultats, l'auteur déduit que le système enzymatique bactérien d'hydroxylation des cycles aromatiques établit des sites électronégatifs sur les carbones du cycle où s'effectuera l'hydroxylation. C'est pourquoi des substituants électroattracteurs ($-Cl$, $-NO_2$) diminuent le taux de dégradation puisqu'ils diminuent l'électronégativité des carbones du cycle tandis que les substituants électrodonneurs ($-COO^-$) l'augmentent.

Du point de vue de la mise en évidence des mécanismes de dégradation des composés phénoliques monosubstitués, Bayley & Wigmore (1973) étudient l'activité des mutants de *Pseudomonas putida* sur les crésols et en montrent la diversité.

En effet, si les crésols subissent le méta-clivage pour produire le 2-hydroxyméthylmucate semi-aldéhyde, ce dernier est hydrolysé en 2-oxypent-4-énoate lorsque la source de carbone correspond à l'ortho crésol ou au méta crésol, ou bien est dégradé en dérivé de l'acide oxalocrotonique lorsque la source de carbone est le para crésol.

Si les mécanismes d'assimilation des dihydroxybenzènes (catéchol, protocatéchuate, gentisate) ont été bien étudiés, il n'en est pas de même pour les trihydroxybenzènes.

Samain *et al.* (1986) ont mis en évidence l'étape initiale du métabolisme de quelques trihydroxybenzoates par *Pelobacter acidigallici* en milieu anaérobie (Figure 52).

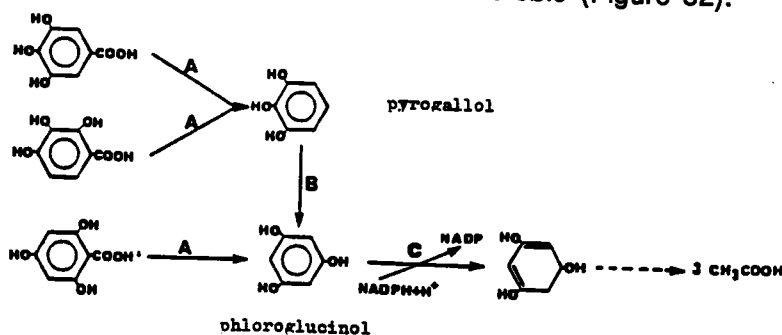


Figure 52 : Métabolisme de dégradation de trois trihydroxybenzoates par *Pelobacter acidigallici* en anaérobie. Les premières phases de la dégradation nécessitent trois enzymes A, B, C.

Ce schéma métabolique montre que le phloroglucinol est un métabolite commun de la dégradation des trois trihydroxybenzoates. Il est obtenu après l'intervention d'une décarboxylase (A) et d'une isomérase (B). La perte d'aromaticité du cycle est due à une phloroglucinol réductase NADPH dépendante (C). La bactérie assimile ensuite ces molécules sous forme d'acétate.

2.3.3.8. Les phtalates

A cause de leur très large production industrielle et de leur utilisation à grande échelle, les phtalates sont devenus des polluants de l'environnement si importants que l'Agence Américaine de la Protection de l'Environnement (U.S.E.P.A.) a placé six d'entre eux (dibutylphtalate) sur la liste des polluants prioritaires.

Aussi, O'Grady et al. (1985) ont étudié la biodégradation sur boues activées de douze esters phtalates commerciaux et Eaton & Ribbons (1982) ont proposé un mécanisme de dégradation avec *Micrococcus sp.* souche 12B (Figure 53).

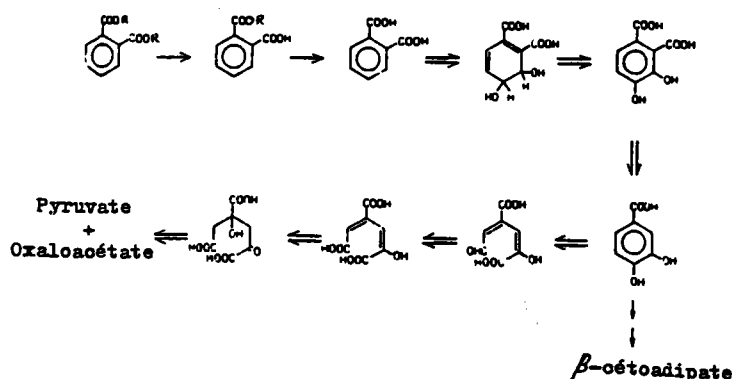


Figure 53 : Mécanisme de dégradation des phtalates par *Micrococcus sp.* souche 12B.

Ce mécanisme mène à la production d'acide phtalique qui est ensuite hydroxylé et décarboxylé en protocatéchuate ; le protocatéchuate est ensuite assimilé sous forme de pyruvate ou d'acétyl CoA.

2.3.3.9. Les hydrocarbures azotés

2.3.3.9.1. L'aniline et ses dérivés

Les études accomplies sur la dégradation de l'aniline et ses dérivés montrent que le mécanisme est caractérisé, d'une part par l'élimination de l'azote par production d'ammoniaque et, d'autre part par l'hydroxylation du cycle aromatique en catéchol. Aoki *et al.* (1983) observent ce mécanisme avec la souche *Rhodococcus erythropolis* AN13 (Figure 54).

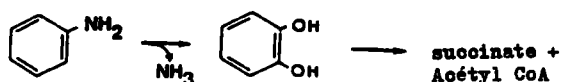


Figure 54 : Mécanisme de dégradation de l'aniline par *Rhodococcus erythropolis* AN13.

Le même mécanisme est observé par Raabe *et al.* (1984) lors de la dégradation de la para-toluidine par *Pseudomonas testosteroni*.

Pitter (1984 & 1985) étudie comme pour les dérivés phénoliques (cf. 2.3.3.7.) le taux de dégradation des composés monosubstitués en ortho, méta et para de l'aniline avec une culture bactérienne mixte provenant de boues activées d'une station de traitement des eaux usées.

Les résultats obtenus indiquent la même tendance et les conclusions sont similaires avec celles obtenues avec les composés phénoliques.

Les chloroanilines sont des dérivés de l'aniline qui, de par leur large utilisation dans les synthèses d'herbicides et de produits pharmaceutiques, sont maintenant largement étudiés du point de vue de leur biodégradabilité.

Latorre *et al.* (1984) proposent un mécanisme de dégradation des monochloroanilines (Figure 55).

Les bactéries capables de métaboliser les monochloroanilines sont obtenues par un échange naturel de capacité génétique entre une souche de *Pseudomonas* sp. capable de dégrader l'aniline ou la toluidine et la souche *Pseudomonas* B13 capable d'assimiler les chlorocatéchols (Steiert & Crawford, 1985).

Quant à la dégradation des dichloroanilines, elle implique des mécanismes encore plus complexes, en particulier si le milieu est riche en nitrates ou en nitrites (Corke *et al.*, 1979 ; Minard *et al.*, 1977 ; Neilson *et al.*, 1985) (Figure 56).

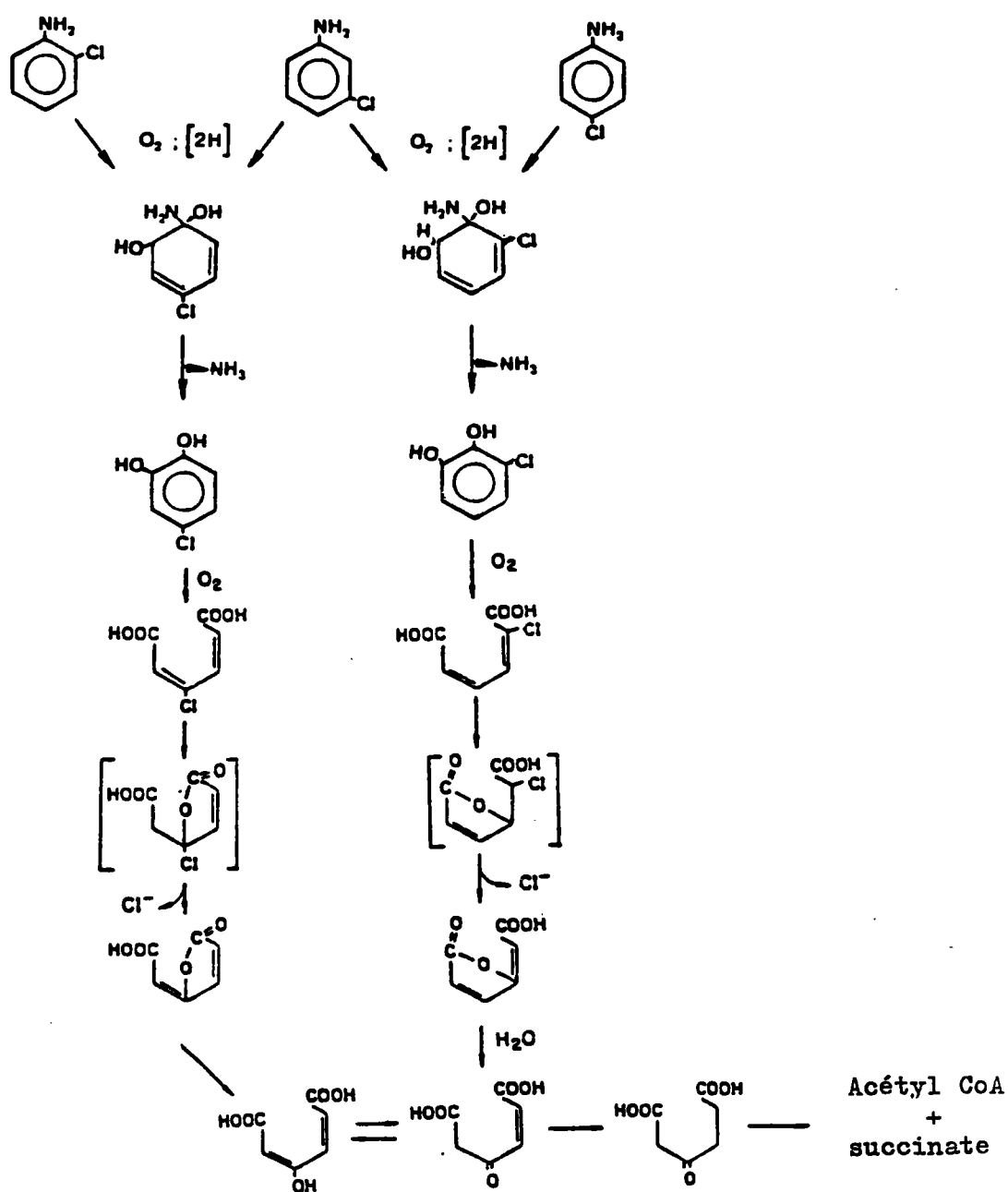


Figure 55 : Métabolisme de dégradation des monochloroanilines.

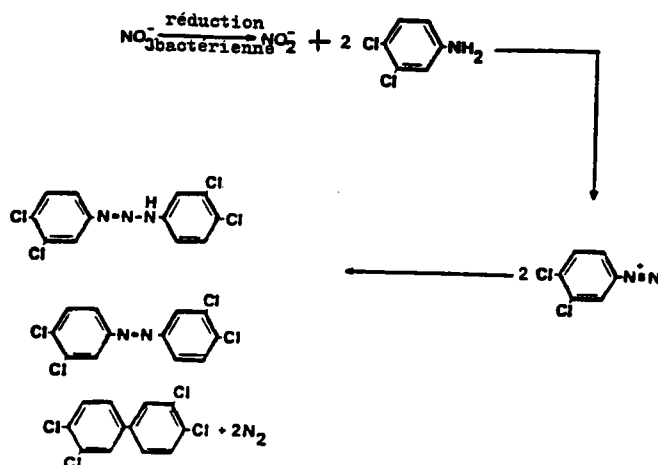


Figure 56 : Séquence de conversion du 3,4-dichloroaniline par *Escherichia coli*.

Le mécanisme montre une assimilation de l'azote des nitrates ou des nitrites par le micro-organisme pour former un ion diazonium.

Différentes molécules (azobenzène, triazène bis substitué, chlorobiphényle) sont ainsi formés via l'ion diazonium.

2.3.3.9.2. Les composés aromatiques nitro-substitués

La dégradation des composés aromatiques nitro-substitués est caractérisée par une phase de réduction pendant laquelle il y a production d'un dérivé de l'aniline.

Ces dérivés de l'aniline sont ensuite dégradés suivant le mécanisme présenté dans le chapitre précédent.

Ainsi Nyholm et al. (1984) étudient la dégradation du 4-nitrophénol et Cerniglia (1984c) propose un mécanisme de dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques nitro-substitués (Figure 57).

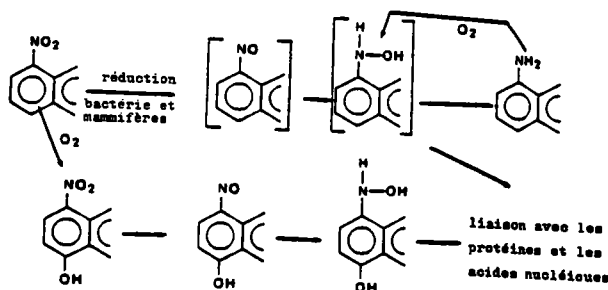


Figure 57 : Activation métabolique des hydrocarbures nitro-substitués.

La réduction des hydrocarbures nitro-substitués passe par l'intermédiaire nitroso et hydroxylamine avant d'aboutir à un dérivé de l'aniline. Cette réduction mène à la formation de composés mutagènes et carcinogènes puisque les intermédiaires hydroxylamines peuvent se fixer sur les protéines et les acides nucléiques.

2.3.3.9.3. Les hydrocarbures azotés hétérocycliques

La pyridine est l'un des hétérocycles les plus simples qui apparaît dans l'environnement en tant que sous-produit de la gazéification du charbon. Ce composé est mobile dans le sol et peut persister dans les eaux souterraines.

A cause de sa toxicité modérée et sa tératogénicité probable, Sims *et al.* (1986) ont étudié sa biodégradabilité avec *Micrococcus luteus* (Figure 58).

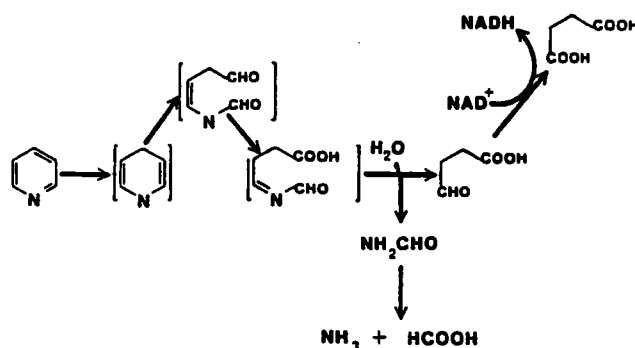


Figure 58 : Métabolisme de dégradation de la pyridine avec *Micrococcus luteus*.

La dégradation de la pyridine est tout à fait remarquable, car le mécanisme de dégradation ne passe pas par l'intermédiaire de dihydroxylation du cycle. Ce phénomène a été montré par le fait que le microorganisme ne puisse croître sur le 2,3-dihydroxypyridine.

Les hétérocycles à noyau indolique sont une famille bien connue de par leur intérêt en agro-alimentaire et en pharmacie.

Sur le plan microbiologique, certaines bactéries comme *Escherichia coli* dégradent le tryptophane en indole (Figure 59).

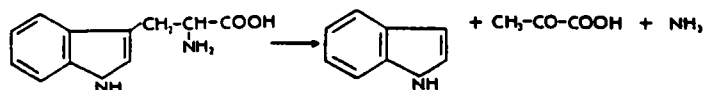


Figure 59 : Dégradation du tryptophane en indole par *Escherichia coli*.

L'enzyme responsable de cette réaction est la tryptophanase dont le coenzyme est le pyridoxal phosphate (Boulanger *et al.*, 1973).

Cette réaction fait partie, d'ailleurs, de la batterie de tests qui permet l'identification des bactéries.

Cependant, toutes les bactéries ne dégradent pas le tryptophane en indole.

Ainsi, Hegeman (1966) propose le mécanisme suivant de dégradation du tryptophane par *Pseudomonas putida* (Figure 60).

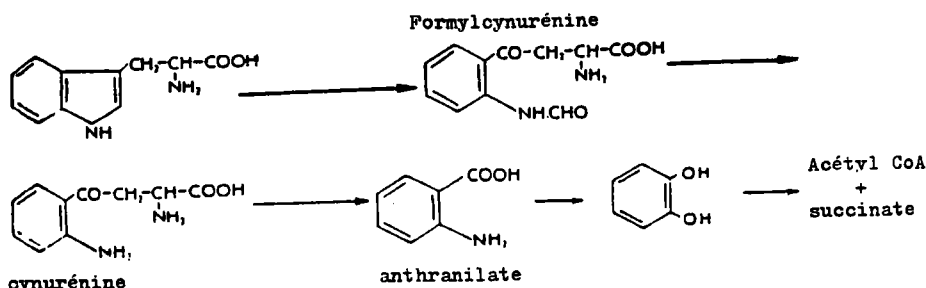


Figure 60 : Mécanisme de dégradation du tryptophane par *Pseudomonas putida*.

La dégradation du tryptophane débute par l'ouverture de l'hétérocycle pour former le formylcynurénine qui, par décarboxylation et libération d'alanine, donne l'antranylate puis le catéchol dont les mécanismes de dégradation sont bien connus.

De la même façon, l'indole peut être dégradé en anthranilate. Inversement, la biosynthèse du tryptophane à partir de l'antranylate a été étudiée chez différents microorganismes. Les différentes étapes sont rapportées dans la figure suivante (Figure 61).

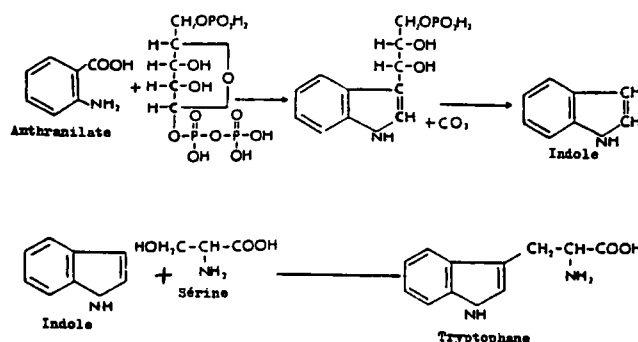


Figure 61 : Biosynthèse du tryptophane (Boulanger *et al.*, 1973).

La formation de l'indole dans la biosynthèse du tryptophane est obtenue par réaction entre l'antranylate et 5-phosphoribosyl/1-pyrophosphate pour donner l'indole 3-glycérol-phosphate.

Quant à la formation du tryptophane, il est probable que la sérine se combine au pyridoxal-phosphate de la tryptophane synthétase, et qu'une déshydratation se produit alors entre le groupe hydroxylé et l'hydrogène du carbone α de la sérine pour donner un dérivé de l'acide amino-acrylique [$\text{CH}_2 = \text{C}(\text{NH}_2) - \text{COOH}$] qui se condense avec l'indole en position 3.

Confirmant ce mécanisme, Skogman & Sjöström (1985) observent avec une souche modifiée de *Escherichia coli* (W3110) la production de L-tryptophane à partir de l'indole et de 5-hydroxy-L-tryptophane à partir de 5-hydroxyindole.

Un autre mécanisme de dégradation de l'indole a été mis en évidence par Wang *et al.* (1984) en milieu anaérobie. Ce mécanisme mène à la production de méthane, de dioxyde de carbone et d'hydroxyde d'ammonium.

En ce qui concerne les hétérocycles plus complexes comme le carbazole, le benzo [f] quino-line ou encore le 7H-dibenzo [c,g] carbazole, aucun mécanisme de dégradation n'a jusqu'alors été étudié.

Cependant, Bohonos *et al.* (1977) montrent dans un screening de molécules complexes, que ces hétérocycles sont biodégradables.

Ils proposent d'ailleurs un mécanisme de dégradation du dibenzothiophène (Figure 62) dont la structure est proche de celle du carbazole.

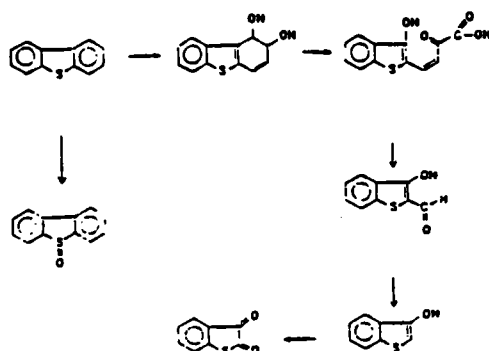


Figure 62 : Métabolisme de dégradation du dibenzothiophène (Bohonos *et al.*, 1977).

Le mécanisme de dégradation du dibenzothiophène n'est pas connu complètement ; cependant les métabolites qui ont été isolés permettent d'observer, comme pour les mécanismes du phénanthrène et de l'anthracène, qu'un seul cycle aromatique subit l'attaque bactérienne et que, de ce fait, le noyau benzothiophène est conservé, tout du moins pendant une partie du métabolisme.

2.3.3.9.4. Mécanisme théorique de dégradation du carbazole

En se référant aux mécanismes de dégradation du benzène (cf. 2.3.3.1.), du naphthalène (cf. 2.3.3.4.), du phénanthrène et de l'anthracène (cf. 2.3.3.5.), du tryptophane et du dibenzothiophène (cf. 2.3.3.9.3.), un mécanisme de dégradation théorique du carbazole peut être établi (Figure 63).

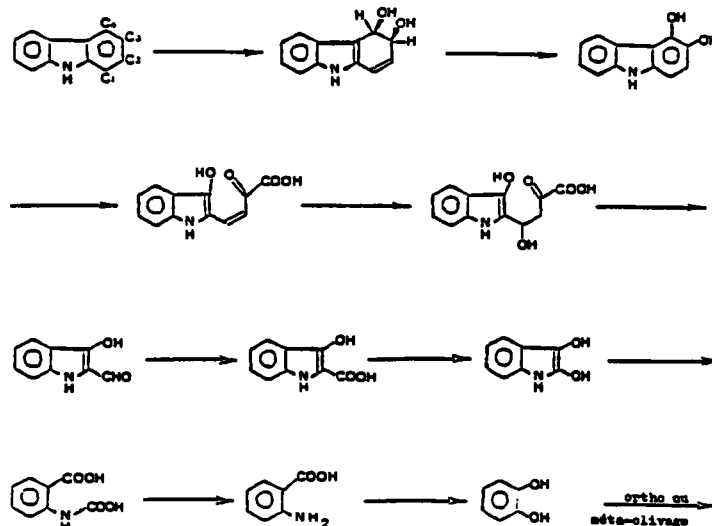


Figure 63 : Mécanisme théorique de dégradation du carbazole.

Après avoir subi une oxydation en diol, un des cycles aromatiques est assimilé sous forme de pyruvate par la bactérie après un méta-clivage.

Le formyl-2 hydroxy-3 indole formé est oxydé pour produire différents précurseurs de l'indole. La dégradation doit se poursuivre par l'ouverture de l'hétérocycle pour produire successivement l'anthranilate et le catéchol. Le catéchol peut être ensuite assimilé, soit sous forme de pyruvate et d'acétaldéhyde, soit sous forme d'acétyl CoA et de succinate.

Basé sur l'étude bibliographique de certaines molécules dégradées par les bactéries capables de les utiliser, le schéma présenté ci-dessus est théorique.

N'ayant jamais été étudié, il est possible que le mécanisme de dégradation soit totalement différent car celui-ci dépend des capacités enzymatiques des bactéries capables d'utiliser le carbazole comme source de carbone.

La mise en évidence de métabolites de dégradation du carbazole avec différentes bactéries capables de l'utiliser comme source de carbone, permettra peut-être d'établir le véritable mécanisme de dégradation.

2.4. CHOIX ENTRE CULTURES PURES ET CULTURES MIXTES DANS L'ETUDE DE LA BIODEGRADATION

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les hydrocarbures représentent une vaste famille de molécules très différentes de par leur structure (alcane, alcène, alicyclique, aromatique...), leur poids moléculaire, leurs propriétés... De plus, les hydrocarbures sont rarement à l'état pur, mais se rencontrent généralement à l'état de mélanges très complexes (huiles, goudrons, pétrole...).

Par contre, les bactéries se comportent comme des spécialistes dans le sens où elles n'utilisent que certaines structures comme source de carbone.

La diversité des hydrocarbures et la spécificité des bactéries sont a priori, deux paramètres antagonistes. Ceci montre qu'il est nécessaire de choisir avec beaucoup de soin le type de culture à utiliser pour l'étude d'une biodégradation.

Ce chapitre se propose de montrer les avantages et les inconvénients qui peuvent être rencontrés lors de l'étude de la dégradation d'un hydrocarbure avec une culture pure ou bien avec un mélange de souches bactériennes appelé culture mixte.

2.4.1. LES CULTURES PURES

S'il est vrai que quelques bactéries sont capables de dégrader et d'assimiler complètement certains substrats (*Pseudomonas sp.* peut par exemple dégrader totalement le naphthalène, cf.

2.3.3.4.), d'autres sont incapables de se multiplier et donc d'utiliser certaines sources de carbone, ou bien sont limitées à une séquence de transformation avec accumulation de produits de dégradation intermédiaires dans le milieu (Figures 64 et 65).

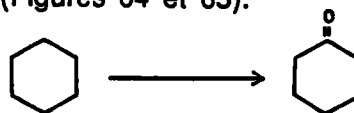


Figure 64 : Oxydation du cyclohexane par *Mycobacterium vaccae* souche JOB-5 (Ooyama & Foster, 1965).

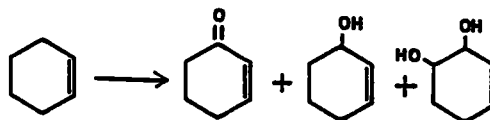


Figure 65 : Oxydation du cyclohexène par *Aspergillus niger* (Bhattacharyya & Ganapathy, 1965).

Les figures 64 et 65 montrent l'intérêt des cultures pures, si l'on souhaite retrouver dans un milieu de culture des métabolites particuliers de dégradation. Le second intérêt réside dans la meilleure maîtrise des fermenteurs contenant une culture pure.

En effet, les techniques de contrôle de la croissance bactérienne sont bien connues et les taux de production des métabolites de dégradation peuvent alors être aisément réglés.

Le choix d'une culture pure présente cependant deux inconvénients. En effet, pour trouver la souche intéressante, il est généralement nécessaire d'effectuer un screening de bactéries qui peut être long et coûteux.

Le second inconvénient réside dans la fragilité d'une telle culture. En effet, il est toujours possible de contaminer la souche par d'autres bactéries capables d'utiliser les métabolites, produits par la souche pure, comme source de carbone.

2.4.2. LES CULTURES MIXTES

Le but des cultures mixtes est de mettre en commun les compétences de différents microorganismes, et ceci généralement pour créer une association dans laquelle chaque organisme agit de façon complémentaire.

C'est ainsi qu'un mélange de souches ou/et d'espèces bactériennes a pour but de mener à bien la dégradation de milieux carbonés complexes - comme le sont le plus souvent les hydrocarbures - que des souches bactériennes très spécialisées sont alors incapables de biodégrader à elles seules.

C'est ainsi que Rambeloarisoa *et al.* (1984) observent, grâce à une culture mixte constituée de 8 souches bactériennes (2 *Acinetobacter*, 2 *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Micrococcus* et *Bacillus*), une biodégradation de 83 à 92% du pétrole brut.

Parallèlement, la dégradation du pétrole brut par une culture mixte en fermenteur a mené à la disparition de 97% des composés saturés, 81% des aromatiques, 52% des hydrocarbures polaires et 74% des asphaltènes (Bertrand *et al.*, 1983).

De plus, lors de l'étude de la dégradation de quatre pétroles bruts de compositions différentes, Westlake *et al.* (1974) observent que les bactéries gram-négatif sont dominantes dans les cultures mixtes.

De telles associations de bactéries tendent à mener à la biodégradation ultime des sources de carbone et ne se limitent pas à une séquence de transformation avec accumulation de produits terminaux dans le milieu comme les cultures pures peuvent le faire.

C'est ainsi que le cyclohexane peut être utilisé comme source de carbone. En effet, si la souche *Mycobacterium* JOB-5 est capable d'oxyder le cyclohexane en cyclohexanone (cf. 2.4.1.), elle n'est pas capable de l'utiliser comme source de carbone ; par contre, la souche bactérienne CY-6 est capable d'utiliser la cyclohexanone comme substrat. La combinaison des deux souches conduit donc à la dégradation totale du cyclohexane (Figure 66) (Beam & Perry, 1973, 1974).

De plus, ce cas n'est pas unique puisque deux autres souches (*Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas sp.*) sont aussi capables, en association, de dégrader le cyclohexane (Figure 66) (De Klerk & Van der Linden, 1974).

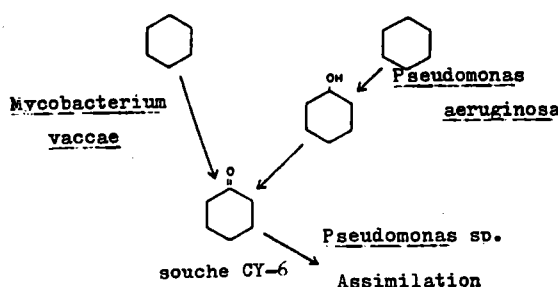


Figure 66 : Utilisation du cyclohexane par des cultures mixtes.

Une étude similaire a été menée avec le dodécylcyclohexane qui est une source de carbone non biodégradable jusqu'au stade ultime par une souche bactérienne pure. Par contre, une culture mixte de *Mycobacterium rhodochrous* et de *Arthrobacter sp.* aboutit à la minéralisation complète du dodécylcyclohexane (Figure 67) (Slater & Bull, 1982). *Mycobacterium rhodochrous* métabolise la chaîne de carbone du substituant par β -oxydation, mais ne peut dégrader le cyclohexaneacétate. Ce dernier s'accumule donc dans le milieu et peut être dégradé par *Arthrobacter sp.* qui est, par ailleurs, incapable de croître sur le dodécylcyclohexane.



Figure 67 : Minéralisation complète du dodécylcyclohexane par attaque synergique de deux bactéries.

Si la dégradation complète de l'acide 3, 4, 5-triméthoxybenzoïque peut être accomplie facilement par une souche pure en aérobiose, il n'en est pas de même en anaérobiose où il faut le concours de trois souches bactériennes différentes pour aboutir à la minéralisation totale de la molécule (Kreikenbohm & Pfennig, 1985) (Figure 68).

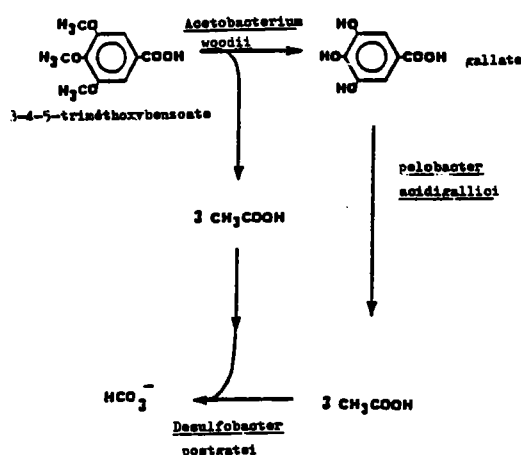


Figure 68 : Dégradation totale du 3, 4, 5-triméthoxybenzoate à l'aide d'une population mixte en anaérobiose.

Les exemples présentés ci-dessus nécessitent l'association de deux à trois souches bactériennes pour aboutir à la dégradation totale de certaines sources de carbone. En fait, dans le milieu naturel, les cultures mixtes peuvent être beaucoup plus complexes.

C'est ainsi qu'un échantillon de sol enrichi continuellement avec le 2-chloropropionamide comme source de carbone et d'énergie permet d'observer une communauté bactérienne constituée de six microorganismes (Figure 69) (Slater & Bull, 1982).

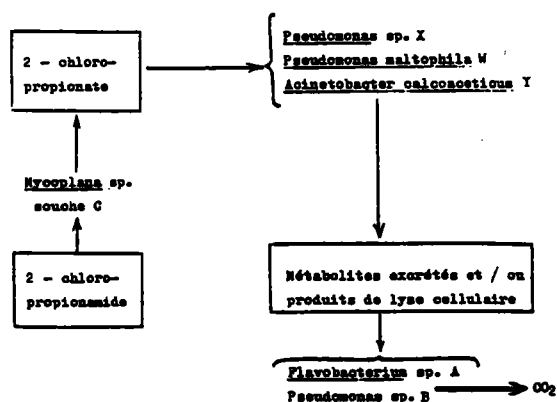


Figure 69 : Dégradation totale du 2-chloropropionamide par une culture mixte de six bactéries.

Le métabolisme de dégradation est basé sur l'action enzymatique de l'amidase de *Mycoplasma* sp. souche C. Ceci est confirmé par le fait que trois autres microorganismes sont capables de croître sur le 2-monochloropropionate qui correspond justement au produit de déamination du 2-chloropropionamide.

Les deux bactéries restantes n'ayant aucune activité dans la dégradation du 2-chloropropionamide et du 2-chloropropionate, il est probable qu'elles utilisent les métabolites excrétés par les autres bactéries ou leurs produits de lyse cellulaire.

Tous les exemples de dégradation présentés dans ce chapitre permettent de définir l'utilité mais aussi les inconvénients des cultures mixtes.

Intérêts d'une culture mixte

- . Stabilité du consortium bactérien : pour obtenir une culture mixte stable et efficace, il est nécessaire de prévoir une période d'adaptation (une dizaine de générations) (Salmon & Bull, 1984). Une fois la période d'adaptation passée, les cultures résistent mieux aux variations de pH et de température qu'une culture pure, même si des variations dans la répartition des différentes populations sont observées.

- . Possibilité de minéraliser des sources carbonées complexes comme les huiles, les goudrons, le pétrole brut.

- . Possibilité d'associer deux microorganismes spécialisés, capables de donner le produit recherché.

- . Possibilité de créer de nouvelles souches grâce aux transferts génétiques toujours possibles entre deux souches. C'est ainsi que l'activité combinée de *Pseudomonas putida* souche mt-2 (capable de métaboliser les halobenzoates en halocatéchols avec accumulation de ces derniers sans les dégrader) et de *Pseudomonas* sp. B13 (capable de minéraliser uniquement les halocatéchols) a permis d'isoler une souche pure capable de dégrader totalement le 4-chlorobenzoate, ce que les souches parentes étaient incapables de faire. Cette nouvelle souche a été obtenue grâce au transfert du plasmide TOL de *Pseudomonas putida* souche mt-2 dans *Pseudomonas* sp. souche B13. Cette souche peut ensuite être utilisée en culture pure avec les avantages que cela comporte (Slater & Bull, 1982).

Inconvénients d'une culture mixte

- . Risque d'une association menant à la biodégradation ultime de la source de carbone étudiée sans pouvoir observer dans le milieu de culture l'accumulation de métabolites.

. Risque d'une association compétitive. Si les différents microorganismes agissent sur la même séquence de dégradation, la culture mixte n'aura jamais la stabilité d'une culture pure et présentera les mêmes inconvénients.

. Les cultures mixtes, du fait de leur plus grande stabilité, présentent moins de "maléabilité" qu'une culture pure.

En définitive, une association de bactéries permet généralement une meilleure dégradation des hydrocarbures. Cependant, la mise en évidence des métabolites et du mécanisme de dégradation de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone par la culture mixte risque d'être plus difficile à étudier, en particulier lorsque l'association mène à la biodégradation ultime de la source de carbone.

Dans le cas où l'étude a pour but de mettre en évidence des produits de dégradation intermédiaires, il est préférable de travailler avec une culture pure plutôt qu'avec une culture mixte, à moins de connaître parfaitement les capacités enzymatiques de chacune des bactéries utilisées.

2.5. RECHERCHES ET TECHNIQUES DE DETERMINATION DE MICROORGANISMES CAPABLES DE DEGRADER LES HYDROCARBURES

La mise en évidence, l'isolement et l'identification de microorganismes capables d'utiliser comme source de carbone la molécule carbonée étudiée, constituent la phase préliminaire et indispensable sur laquelle reposeront toutes les études de métabolismes et d'identifications de produits de dégradation.

Ce chapitre se propose d'inventorier les différents sites susceptibles d'abriter des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures et les différentes méthodes de détection, d'isolement et d'identification de ces microorganismes.

2.5.1. SOURCES DES MICROORGANISMES

L'obtention des organismes capables de dégrader des hydrocarbures peut s'effectuer de quatre façons différentes :

. Prélèvements d'échantillons d'eaux de rivières, de lacs ou de mers, et de sédiments qui reçoivent continuellement des hydrocarbures en raison de la présence d'un site industriel à proximité (Austin *et al.*, 1977 ; West *et al.*, 1984 ; Rontani *et al.*, 1985a) ; Shaler & Klecka, 1986.

- . Enrichissement d'échantillons d'eaux ou de sols en hydrocarbures (Davies & Evans, 1964 ; Evans *et al.*, 1965 ; Bohonos *et al.*, 1977 ; Eaton & Ribbons, 1982 ; Kiyohara *et al.*, 1982 ; Durham *et al.*, 1984).

- . Utilisation de microorganismes conservés en laboratoire et dont les capacités enzymatiques sont connues (Evans *et al.*, 1965 ; Bayly & Wigmore, 1973 ; Barnsley, 1976 ; Blasig *et al.*, 1984 ; Cerniglia *et al.*, 1984a ; Chen *et al.*, 1985).

- . Prélèvement dans des citernes de stockage d'hydrocarbures (Hill, 1969).

2.5.2. ADAPTATION DES MICROORGANISMES A LA SOURCE DE CARBONE

Quelle que soit la provenance des microorganismes, il est indispensable dans un premier temps de mettre en oeuvre des cultures en batch pour l'adaptation et la sélection des microorganismes capables de dégrader l'hydrocarbure choisi comme source de carbone.

Il est souvent nécessaire de faire en sorte que les microorganismes utilisent l'hydrocarbure comme seule source de carbone (Diarra *et al.*, 1984).

2.5.3. DETECTION DES MICROORGANISMES CAPABLES DE DEGRADER LA SOURCE DE CARBONE

Diverses techniques fondées sur les mesures d'activités physiologiques des microorganismes permettent de savoir si un microorganisme est capable ou non de biotransformer un hydrocarbure.

La consommation d'oxygène dissous et la production de dioxyde de carbone dans le milieu de culture ainsi que la multiplication cellulaire sont les preuves qu'un microorganisme aérobic est capable d'utiliser une source de carbone.

Des techniques simples permettent d'observer ces activités physiologiques :

- . Des électrodes permettent de suivre dans le temps la consommation d'oxygène dissous (Feist & Hegeman, 1969 ; Umezawa *et al.*, 1983 ; Tadasa & Kayahara, 1983).

- . L'isotope ^{14}C permet de suivre la production de dioxyde de carbone dans le milieu ($^{14}\text{CO}_2$) (Hwang *et al.*, 1985 ; Zeyer *et al.*, 1985 ; Bauer & Capone, 1985a & 1985b).

- . L'évolution de la population cellulaire elle-même suivie en mesurant la turbidité du milieu de culture (Kiyohara *et al.*, 1976) par comptage des colonies sur milieu gélosé (Hill, 1969) ou avec un microscope à épifluorescence après coloration des cellules à l'acridine orange

et en mesurant l'ATP (Hwang *et al.*, 1985). L'observation au microscope des émulsions formées entre l'hydrocarbure et le milieu de culture peut apporter un renseignement supplémentaire sur l'activité du microorganisme (Hill, 1969). Quant à la mesure par chromatographie en phase gazeuse (cf. 8.1.2.1.) de la disparition des hydrocarbures, elle permet de mener un screening des microorganismes capables de dégrader ces hydrocarbures en tenant compte des problèmes de volatilisation et d'absorption ou d'adsorption qui peuvent apparaître lors de ces manipulations (Bedart *et al.*, 1986).

2.5.4. ISOLEMENT DES SOUCHES CAPABLES DE DEGRADER LA SOURCE DE CARBONE

L'isolement des souches nécessite l'utilisation de milieux nutritifs. Une colonie bien isolée sur une boîte de pétri peut être considérée comme représentative d'une souche pure. Si un doute subsiste, il est nécessaire de faire un nouvel étalement sur un milieu nutritif gélosé jusqu'à ce que les contrôles confirment la pureté de la souche.

Par contre, le choix du milieu de culture solide n'est pas standardisé pour isoler uniquement les souches capables de dégrader les hydrocarbures. La technique la plus couramment utilisée consiste à ajouter l'hydrocarbure qui sert de source de carbone dans le fermenteur à l'agar qui constitue le milieu nutritif gélosé (Bourque *et al.*, 1987).

Dans le cas du phénanthrène, il suffit de recouvrir l'agar d'un film opaque de cet hydrocarbure, les souches capables de l'utiliser comme source de carbone formeront des colonies entourées de zones claires débarrassées de l'hydrocarbure (West *et al.*, 1984). Les inocula peuvent aussi être lavés par différentes centrifugations et repris dans un milieu de culture neuf afin d'éliminer les impuretés (autres sources de carbone) avant d'être étalés sur un milieu gélosé. Toutes ces manipulations impliquent cependant de nombreuses pertes en microorganismes (Walker & Colwell, 1976).

Plusieurs milieux gélosés différents dopés en hydrocarbures peuvent être comparés. Celui qui produira le moins de colonies peut être considéré le plus spécifique des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures (Walker & Colwell, 1976).

L'idéal serait de montrer une corrélation entre le nombre de bactéries capables de dégrader l'hydrocarbure et la concentration de celui-ci. Une telle mise au point donnerait un renseignement fondamental en vue d'une bonne identification. Les résultats sont cependant médiocres car aucune corrélation n'a été observée avec des mélanges complexes, comme les huiles de moteur, et n'est pas observée systématiquement avec des extraits légers comme des coupes benzéniques (Walker & Colwell, 1976).

2.5.5. IDENTIFICATION DES SOUCHES CAPABLES DE DEGRADER LA SOURCE DE CARBONE

Une fois l'isolement accompli sur une gélose inclinée, la bactérie sera identifiée suivant toute une batterie de tests.

S'il s'agit d'une souche fournie par un laboratoire, il suffit de la confirmer par identification avec une gamme API qui permet d'étudier les caractères biochimiques et physiologiques (Diarra et al., 1984). La gamme API ne permet pas toujours d'identifier avec certitude une bactérie. Mais, en plus de la gamme API, il existe de nombreux tests pour mettre en évidence d'autres caractères biochimiques, culturels (croissance ou non à différentes températures), morphologiques et physiologiques.

Austin *et al.* (1977) ont ainsi étudié 48 caractères différents pour identifier des bactéries capables d'utiliser le pétrole brut comme source de carbone et West *et al.* (1984) 123 caractères pour identifier des bactéries capables d'utiliser le phénanthrène.

Ces derniers ont d'ailleurs créé un programme informatique pour comparer les souches susceptibles de dégrader le phénanthrène à des souches témoins capables de le dégrader et dont tous les caractères sont informatisés. Une fois les souches isolées et identifiées, l'étude de la biodégradation proprement dite peut débiter avec l'étude des métabolites produits par les bactéries.

2.6. FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES INFLUANT SUR LA BIODEGRADATION

Les microorganismes, comme tout être vivant, subissent l'influence du milieu extérieur. Lorsque le milieu ne présente plus les conditions idéales pour le microorganisme, celui-ci doit adapter son métabolisme aux nouvelles conditions ou bien disparaître.

Les facteurs physico-chimiques influant sur les cultures en milieu aqueux sont généralement :

- . le pH
- . la température
- . l'oxygène dissous
- . les sources de carbone, d'azote et de phosphore
- . l'ionité du milieu de culture.

2.6.1. INFLUENCE DU pH

Le pH est un facteur physico-chimique qui peut intervenir sur la croissance bactérienne, sur la cinétique de dégradation des sources de carbone et sur la production de métabolites.

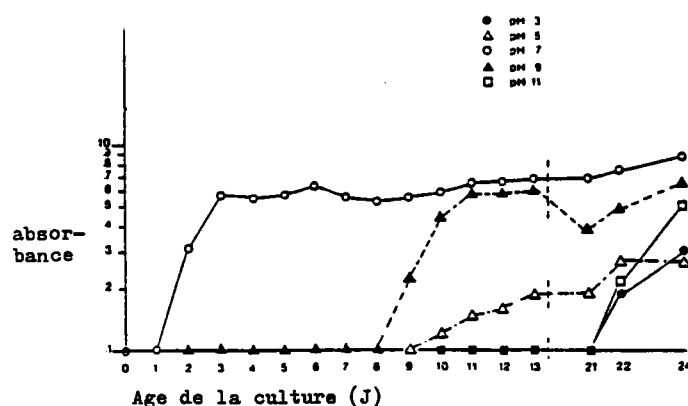


Figure 70 : Evolution de la croissance bactérienne (culture mixte) dans cinq milieux, dont la source de carbone est le dextrose, à cinq valeurs de pH différentes (Lennox & Kuchera, 1986).

La figure 70 montre que les conditions de croissance d'une population bactérienne mixte sont optimales à pH 7 puisque dans ces conditions, la croissance débute dès le deuxième jour de culture, alors qu'il faut attendre le neuvième pour l'observer à pH 5 et 9 et le vingt-deuxième à pH 3 et 11.

Les pH 3, 5, 9 et 11 sont peu favorables à la croissance des microorganismes en présence de dextrose et ceci nécessite une période d'adaptation de la part des bactéries.

Il s'agit en fait d'une sélection des microorganismes. Cette sélection est fonction du pH puisque les bactéries dominantes de la culture mixte ne sont pas les mêmes d'un pH à l'autre.

Le pH peut aussi jouer un rôle sur la vitesse de dégradation des sources de carbone. C'est ainsi qu'il a été montré que le carbaryl est dégradé plus rapidement à pH alcalin qu'à pH acide (Larkin & Day, 1985), que les insecticides ont une durée de demi-vie plus courte à pH 8 qu'à pH 4,5 (Chapman & Cole, 1982), que *Fusarium culmorum* a une activité maximale de biodégradation des acides gras acylaminés à pH 6,5 et 7 (Madhosingh & Orr, 1984), et que l'hydrocarbure benzo aromatique polycyclique (a)pyrène est dégradé plus rapidement à pH 8 dans des sédiments (Delaune *et al.*, 1981).

Le pH peut être choisi en fonction de la production de métabolites, ce qui n'est pas forcément lié au fait que la croissance bactérienne et la cinétique de dégradation de la source de carbone soient les plus élevées.

Clostridium sporogens, en présence de glucose, produit 2,0 $\mu\text{moles/ml}$ à pH 5 et 22 $\mu\text{moles/ml}$ à pH 6,5 d'acides organiques (acides formique, propionique, butyrique...) (Montville *et al.*, 1985). Dans ce cas, pour étudier les produits acides de dégradation, il faut donc se situer à pH 6,5 plutôt qu'à pH 5. Il est d'ailleurs remarquable que dans ce cas, la production des métabolites évolue dans le même sens que le taux de croissance ($0,20 \text{ h}^{-1}$ à pH 5 et $0,86 \text{ h}^{-1}$ à pH 6,5).

En fait, dans un milieu de culture, le pH n'est pas un facteur stable dans le temps. La production par la plupart des bactéries de métabolites acides aboutit à une diminution de pH qui peut atteindre 2 unités (Figure 71) ; d'autres bactéries peuvent produire aussi des métabolites alcalins capables d'augmenter le pH (Lennox & Kuchena, 1986).

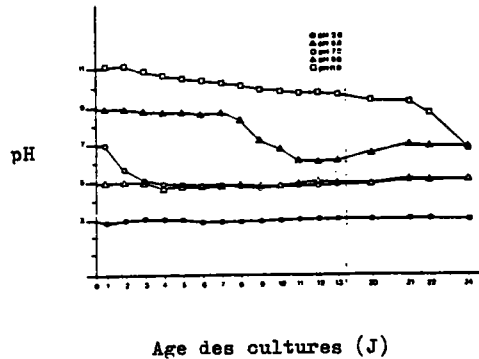


Figure 71 : Evolution du pH en fonction de l'âge de cinq cultures dont la source de carbone est le dextrose et pour cinq valeurs de pH initial différentes (Lennox & Kuchera, 1986).

La figure 71 montre qu'au bout de deux jours, le pH de la culture initialement à pH 7 est identique à celui de la culture initialement à pH 5.

Cependant (Figure 70), les bactéries de la culture à pH 7 atteignent leur phase de croissance exponentielle 7 jours plus tôt que celles de la culture à pH 5. Ceci montre l'importance de la valeur initiale du pH de la culture et la nécessité de faire très attention aux mesures de pH initial et tenir compte des variations de pH que peuvent apporter les stérilisations par autoclavage lors de la préparation des milieux de culture (Lennox & Kuchera, 1986).

Les bactéries ne sont pas les seuls microorganismes à être sensibles aux variations de pH. Nous pouvons par exemple citer le cas de la levure *Candida tropicalis* pour laquelle la cinétique de dégradation de l'hydrocarbure hexadécane évolue en fonction du pH (Figure 72) (Käpelli & Fiechter, 1981).

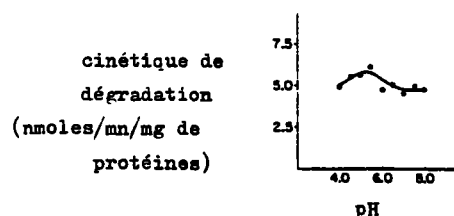


Figure 72 : Influence du pH sur la cinétique de dégradation de l'hexadécane par *Candida tropicalis*.

La figure 72 montre ainsi que la cinétique de dégradation de l'hexadécane évolue en fonction du pH et qu'elle est la plus élevée à pH 5,5 (Käppeli & Fiechter, 1981).

2.6.2. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Comme le pH, la température est un facteur physico-chimique qui peut influencer la croissance bactérienne, la cinétique de la dégradation et la production de métabolites.

L'influence de la température sur la biodégradation d'une source de carbone dépend non seulement de la physiologie du microorganisme, mais aussi de la volatilité de la source de carbone. En général, la cinétique de dégradation est très réduite aux températures extrêmes (0°C et 50°C).

L'étude de la biodégradation du pétrole brut avec des cultures pures ou mixtes montre que celle-ci est plus importante à 20°C qu'à 10°C.

Toutes les fractions (aliphatique, aromatique...) sont sujettes à la biodégradation, que cela soit à 20°C ou à 10°C. Il semble que la volatilité (moindre à 10°C d'un ou de plusieurs composés toxiques) influe sur la cinétique de dégradation du pétrole brut (Atlas, 1975).

La température influe aussi sur la production de produits de dégradation comme le montre l'étude de la fermentation du xylose par les levures *Candida shehatae* et *Pichia stipitis*. Dans la zone de pH comprise entre 4 et 5,5 la production d'éthanol devient maximale avec les deux souches à 30°C. Au-delà de 30°C, *Candida shehatae* produit de moins en moins d'éthanol ; par contre, la production de xylitol est observée. Il en est de même pour *Pichia stipitis* à partir de la température de 36°C. Cette étude montre que le métabolisme des microorganismes peut varier en fonction de la température.

Comme pour le pH, la cinétique de dégradation de l'hydrocarbure hexadécane par *Candida tropicalis* peut évoluer en fonction de la température du milieu (Figure 73) (Käppeli & Fiechter, 1981).

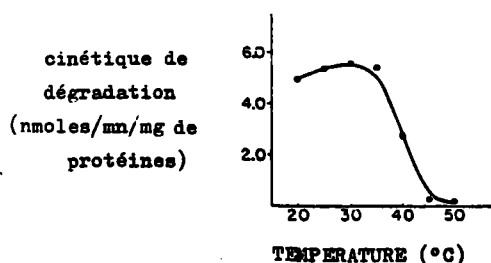


Figure 73 : Influence de la température sur la cinétique de dégradation de l'hexadécane par *Candida tropicalis*.

La figure 73 indique qu'il n'y a essentiellement plus de biodégradation à 50°C et qu'elle est optimale entre 25 et 35°C.

Les figures 72 et 73 montrent que la cinétique de dégradation de l'hydrocarbure hexadécane par *Candida tropicalis* est maximale dans un milieu de culture à pH 5,5 et à la température de 30°C.

2.6.3. INFLUENCE DE L'OXYGENE DISSOUS

L'absence ou la présence d'oxygène dissous dans le milieu de culture est un facteur dominant dans le choix de l'étude à mener. L'absence d'oxygène nécessite de travailler avec des bactéries anaérobies. En milieu anaérobie, la bactérie peut très rarement dégrader totalement un hydrocarbure (cf. 2.3.1.1.2.). En effet, certains mécanismes comme le clivage d'un cycle aromatique nécessite une oxydation (cf. 2.3.3.1.). En anaérobiose, la bactérie, pour utiliser complètement un hydrocarbure comme source de carbone, doit trouver une solution de rechange pour remplacer l'oxygène dissous. C'est ainsi qu'une bactérie utilise sa capacité de dénitrification ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$) pour capter l'oxygène des nitrates afin d'oxyder et dégrader totalement, en l'absence d'oxygène dissous, l'hydrocarbure paracrésol (Figure 74) (Bossert *et al.*, 1986).

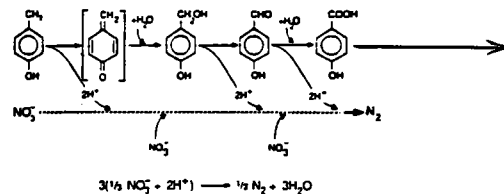


Figure 74 : Représentation schématique du métabolisme de dégradation du paracrésol en anoxie par une bactérie dénitrifiante (en présence de nitrates).

Ce mécanisme montre l'importance de l'oxygène, qu'il soit combiné ou non, dans la dégradation d'un hydrocarbure. En fait, en anaérobiose stricte, la dégradation d'un hydrocarbure peut rarement être totale et s'arrête généralement à la formation, quand cela est possible, de doubles liaisons (cf. 2.3.1.1.2.).

Dans le cas de bactéries aérobies, la dégradation d'une source de carbone s'arrête lorsque la concentration en oxygène dissous se trouve en dessous d'un seuil limite. Ainsi, en dessous de la concentration de 1 mg/l d'oxygène dissous, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique n'est plus dégradé par une culture mixte provenant d'un site industriel (Shaler & Klecka, 1986).

Il est donc absolument nécessaire de maintenir une certaine concentration en oxygène dissous, soit par agitation des cultures (Käppeli & Fiechter, 1981), soit par bullage dans les fermenteurs, pour observer la dégradation totale d'un hydrocarbure.

Par contre, le fait de se placer dans les conditions de carence en oxygène peut permettre d'observer une dégradation partielle de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone et une production de métabolites.

2.6.4. INFLUENCE DE LA SOURCE DE CARBONE

La source de carbone peut influencer sur la croissance des microorganismes suivant trois facteurs : l'état physique, la toxicité et la concentration. Cependant, c'est avant tout de sa solubilité dans le milieu de culture que dépend sa biodégradation (solide, liquide, émulsion...) car les molécules dissoutes dans l'eau sont facilement biotransformées par les bactéries (cf. 2.7.).

La toxicité des hydrocarbures est un second facteur dont il faut tenir compte. En effet, le fait de dissoudre des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un milieu reconstitué (extrait de levure, glucose) permet d'observer en fermenteur fermé une chute du taux de croissance et de la densité bactérienne par rapport à ceux observés dans le milieu reconstitué seul (Calder & Lader, 1976).

L'importance de la diminution du taux de croissance et de la densité bactérienne est fonction de la concentration en hydrocarbures dissous.

Dans certains cas, l'ajout d'hydrocarbures dans un milieu de culture aboutit à l'observation d'une phase de latence plus importante. Cette phase de latence sera d'ailleurs d'autant plus importante que la concentration en hydrocarbures sera élevée (Calder & Lader, 1976 ; Nyholm *et al.*, 1984).

2.6.5. INFLUENCE DE LA SOURCE D'AZOTE

L'azote est absolument nécessaire dans la phase de biosynthèse du métabolisme (anabolisme) qui correspond à la synthèse enzymatique des polysaccharides, des acides nucléiques, des protéines... Généralement, dans les milieux reconstitués, la source d'azote correspond à l'ion ammonium ; cependant, dans certains cas, la source d'azote peut correspondre à un hydrocarbure nitré ou nitrosé. Le dinitrophénol est ainsi utilisé comme source d'azote par *Pseudomonas sp.* N26-8 lors de la biodégradation du succinate dans un milieu carencé en azote minéral (Bruhn *et al.*, 1987).

2.6.6. INFLUENCE DE LA SOURCE DE PHOSPHORE

Le catabolisme et l'anabolisme d'une bactérie nécessitent du phosphore pour remplir leurs fonctions (transferts d'énergie, réactions enzymatiques). La source de phosphore correspond en

fait aux phosphates dissous dans le milieu de culture. La dégradation des hydrocarbures nécessite, comme pour toute source de carbone, la présence de phosphore dans le milieu de culture.

Cependant, un milieu faiblement dopé en phosphore permet la production d'une quantité de métabolites très importante par rapport à la quantité d'hydrocarbures minéralisés. Certaines voies de dégradation étant inhibées, le rendement de production en métabolites peut, dans ces conditions, devenir très élevé. Il est cependant regrettable que la cinétique de dégradation soit plus faible en milieu carencé (Atlas & Bartha, 1972).

L'inhibition de certaines voies métaboliques permet donc d'envisager l'existence d'une sélection des souches bactériennes d'une culture mixte en fonction de la concentration en phosphore (Le Petit & N'Guyen, 1976), et d'observer pour une même bactérie des taux de croissance différents en fonction de la source de carbone dans des milieux de culture ayant la même concentration en phosphore.

2.6.7. INFLUENCE DE L'IONICITE DU MILIEU DE CULTURE

Il est souvent préférable d'enrichir le milieu de culture en oligo-élément pour stimuler la dégradation (Higgins et al., 1984). Cependant, l'ionicté des milieux de culture est généralement due à la présence de chlorure de sodium. Chez les bactéries marines, la présence de chlorure de sodium est généralement nécessaire. Cependant, des concentrations en NaCl trop élevées (supérieures à 20% en poids) aboutissent à une augmentation de la demande en énergie de maintenance de la cellule.

Cette augmentation de l'énergie de maintenance semble liée au fait que la concentration en sodium intracellulaire est, dans ces cas de forte salinité, au moins dix fois moindre que celle du milieu extracellulaire.

La diffusion passive dans le microorganisme des ions sodium Na^+ semble donc compensée par un transport actif de ces mêmes ions vers le milieu de culture. Ce processus, lié aux voies métaboliques de l'ATP, explique l'augmentation de la demande d'énergie.

Globalement, les concentrations élevées en chlorure de sodium correspondent à une diminution des cinétiques de dégradation des hydrocarbures et à une diminution du taux de croissance des microorganismes.

Par contre, l'utilisation d'une source de carbone pour produire une énergie de maintenance aboutit à la production de métabolites (Ward & Brock, 1978).

Globalement, pour étudier la dégradation d'un hydrocarbure en fermenteur, il est nécessaire de contrôler les facteurs physico-chimiques (pH, température, oxygène dissous, ionicté) et les concentrations en carbone, azote et phosphore. Toutefois, ces paramètres doivent être contrôlés en fonction des objectifs donnés.

En effet, leur optimisation doit mener, soit à la minéralisation totale de la source de carbone, soit favoriser la production de métabolites en utilisant par exemple des milieux carencés en phosphore ou bien en oxygène dissous. La préparation d'un milieu de culture avec un taux élevé en chlorure de sodium peut aussi favoriser la production de métabolites.

2.7. SOLUBILISATION DES HYDROCARBURES DANS L'EAU

La dégradation d'une molécule peut s'accomplir facilement une fois solubilisée dans l'eau (Wodzinsky & Bertolini, 1972 ; Wodzinsky & Coyle, 1974) ; pour cela, plusieurs solutions sont possibles :

- . les bactéries synthétisent des molécules ayant des propriétés tensioactives (biosurfactants) capables de solubiliser la source de carbone,
- . des agents de surface de synthèse ayant la capacité de solubiliser les hydrocarbures sont ajoutés dans le milieu de culture,
- . la solubilité de la source de carbone est modifiée par traitement chimique préalable.

L'étude de ces trois possibilités est menée dans les chapitres suivants.

2.7.1. LES TENSIOACTIFS BACTERIENS

Pour utiliser les molécules hydrophobes, les bactéries produisent des tensioactifs dans le milieu pour accélérer la vitesse de solubilisation ou bien pour créer des émulsions dont les propriétés à l'interface permettent à la bactérie d'avoir accès plus facilement à la source de carbone. Ces tensioactifs doivent être constitués d'un groupement hydrophobe, généralement une chaîne hydrocarbonée, qui tend à être repoussé par l'eau et d'un groupement hydrophile qui tend à être attiré. La structure du tensioactif doit lui permettre d'être adsorbé à une ou plusieurs interfaces d'un système hétérogène biphasique comme celui hydrocarbure-eau. Cette adsorption doit modifier les propriétés du système et favoriser l'accès des microorganismes à la source de carbone. Le tensioactif est d'autant plus efficace que sa tension (mN/m) à l'interface est élevée et la concentration minimale (ou critique) pour former un micelle est faible. Il y a formation de micelle lorsque les molécules tensioactives s'agrègent pour former une structure sphérique au centre de laquelle se localisent les groupements hydrophobes.

Cette structure aboutit à la formation d'une surface de contact maximale entre les microorganismes et la source de carbone et permet donc une cinétique de biodégradation et un taux de croissance optima. Les biosurfactants bactériens sont synthétisés après induction du système

enzymatique qui les contrôle. Ils sont de plusieurs "types" et sont fonction évidemment de l'espèce bactérienne, mais aussi du substrat à dégrader : les glycolipides, les acides gras, les phospholipides, les antibiotiques, les biopolymères, la surface cellulaire de la bactérie.

2.7.1.1. Les glycolipides

Les carbohydrates combinés avec de longues chaînes d'acides aliphatiques ou d'hydroxyacides aliphatiques sont appelés glycolipides. Les plus communs sont les glycosyldiglycérides (Figure 75) présents dans les membranes d'un grand nombre de variétés de bactéries (Shaw, 1970).

Le constituant mono, di, tri ou tétrasaccharide peut être composé de glucose, mannose, galactose, acide glucuronique, rhamnose et galactose sulfaté. Les propriétés de surface et d'interface des glycosyldiglycérides bactériens ne semblent pas encore avoir été étudiées de façon approfondie.

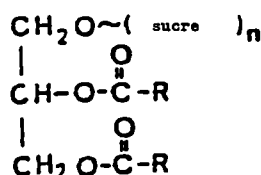


Figure 75 : Structure générale des glycosyldiglycérides. Les plus communs sont constitués de disaccharides contenant du glucose et/ou du galactose.

Les acides gras constituant les glycosyldiglycérides ont généralement une composition similaire à celle des phospholipides du même organisme.

Parmi les glycolipides se retrouvent différentes classes dont la partie osidique est le plus souvent acétylée. Les exemples les plus communs sont :

- . les tréhalolipides
- . les sophorolipides
- . les rhamnolipides.

Hormis ces trois groupes, le tétraacylgucose de *Escherichia coli* (Brennan *et al.*, 1970), le triacylgucose de *Mycoplasma* souche J (Smith & Mayberry, 1968), le lipide mannosylérythritol de *Candida sp.* (Kawashima *et al.*, 1983), les lipides liés à du sucrose et à du fructose de *Corynebacterium* et de *Nocardia* (Suzuki *et al.*, 1974 ; Lang *et al.*, 1984 ; Itoh & Suzuki, 1974) correspondent quant à eux à d'autres sucres acétylés.

L'observation a d'ailleurs montré que l'acétylation de la partie osidique est généralement associée avec la croissance des microorganismes sur des substrats peu solubles dans l'eau comme les hydrocarbures.

2.7.1.1.1. Les tréhalolipides

De nombreux membres du genre *Mycobacterium* croissent en présence d'hydrocarbure en s'agréant en longues chaînes de bactéries. Cette croissance caractéristique est due à la présence sur la surface cellulaire d'esters de tréhalose (Asselineau & Asselineau, 1978), (Bloch, 1950) (Figure 76).

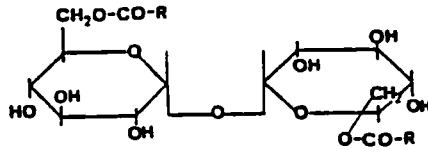


Figure 76 : Ester α, α -tréhalose-6,6'-dicarboxylique ; le lipide tréhalose diffère dans sa structure par les groupements R et R'.

L'analyse structurale montre qu'il s'agit de α, α -tréhalose-6,6'-dimycolates. Les acides mycoliques sont des acides gras α -substitués d'une longue chaîne hydrocarbonée et β -hydroxylés. Les lipides tréhaloses de différentes *Mycobacteria* (Asselineau & Asselineau, 1978) (Barksdale & Kim, 1977 ; Brady & Tranis, 1964 ; Wong *et al.*, 1979), *Corynebacteria* et *Nocardiae* (Itoneda *et al.*, 1970) diffèrent de par la structure des acides mycoliques.

En général, *Nocardia* possède des acides mycoliques contenant approximativement 52 atomes de carbone, *Corynebacterium* 32 atomes de carbone et *Mycobacterium* plus de 60 atomes de carbone (Goodfellow & Minnikin, 1977).

Les cellules d'*Arthrobacter paraffineus* croissant sur hydrocarbures produisent des acides tréhaloses dimycoliques comme tensioactif (Suzuki *et al.*, 1969). Il en est de même pour *Rhodococcus erythropolis* qui produit en fermenteur respectivement 2,1 et 19 g/l d'acides tréhaloses dimycoliques avec pour source de carbone 20 g/l de C₁₂ et 20 g/l de C₁₈ n-alcanes (Rapp *et al.*, 1979).

Le tensioactif extrait avec le n-hexane (Wagner *et al.*, 1983), purifié et hydrolysé, montre que les composés lipophiliques correspondent à un mélange d'acides mycoliques (Kretschmer *et al.*, 1982) (Figure 77).

La composition des acides mycoliques ainsi que le degré d'estérification du tréhalose dépendent des conditions de croissance. Par exemple, dans un milieu carencé en azote, *Rhodococcus erythropolis* produit en grande quantité le tétraester 2,3,4,2' tréhalose (Ristau & Wagner, 1983).

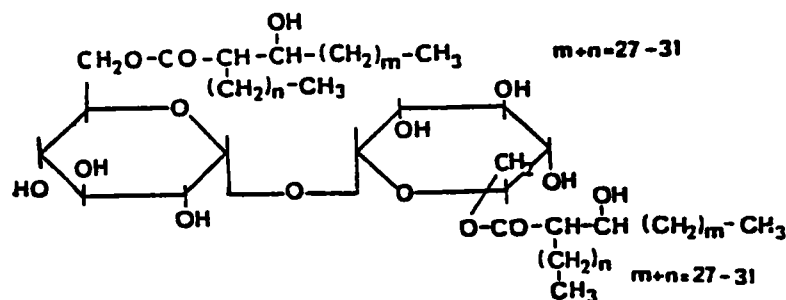


Figure 77 : Lipide tréhalose de *Rhodococcus erythropolis* avec $27 \leq m+n \leq 31$.

Les acides mycoliques sont eux-mêmes des tensioactifs mais les esters de tréhalose sont encore plus puissants.

C'est ainsi qu'avec *Corynebacterium*, la tension à l'interface entre une solution saline et l'hydrocarbure hexadécane est de 6mN/m pour les acides mycoliques tandis qu'elle est de 16 et 17 mN/m pour respectivement le tréhalose monomycolate et dimycolate.

Ces résultats montrent une stabilité environ trois fois plus grande du tréhalolipide à l'interface. Quant à la concentration critique de micellisation, elle est 100 fois plus faible (2 mg/ml) que celle des acides mycoliques libres. De plus, l'ester de tréhalose présente une stabilité chimique et une activité constante dans une large zone de température, de pH et de concentration saline (Kretschmer *et al.*, 1982).

2.7.1.1.2. Les sophorolipides

Différentes espèces de levures *Torulopsis* produisent des glycolipides. L'unité des sucres est composée en un disaccharide sophorose constitué de deux unités glucose liées en β -1,2. Les groupements hydroxyliques 6 et 6' sont généralement acétylés (Figure 78).

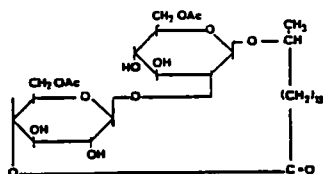


Figure 78 : Structure de la forme lactone du sophorolipide de la levure *Torulopsis bombicola* ATCC 22214 (le groupement carboxylique de l'acide gras peut être sous forme lactone ou bien sous forme hydrolysée pour donner un surfactant anionique).

Les taux de production de sophorolipides par *Torulopsis bombicola* peuvent être très élevés. Ainsi, à la concentration de 200 g/l d'un mélange glucose-huile comme substrat, Ito & Inoue (1982) ont observé une production de 32 g/l de sophorolipides en fermenteur fermé et Cooper & Paddock (1984) de 70 g/l.

2.7.1.1.3. Les rhamnolipides

Certaines espèces de Pseudomonadacées sont connues pour produire de grandes quantités d'un glycolipide (Hauser & Karnovsky, 1954) constitué d'un disaccharide (2 unités de rhamnose liées en β -1,2) et d'un dimère de l'acide β -hydroxydécanoïque (Figure 79) (Edwards & Hayashi, 1965) (Jarvis & Johnson, 1949).

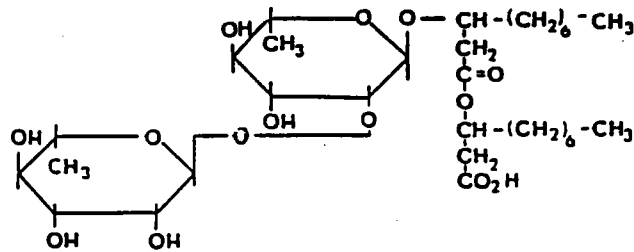


Figure 79 : Structure du rhamnolipide de *Pseudomonas aeruginosa*. Un second rhamnolipide a été identifié chez *Pseudomonas aeruginosa* ne différenciant de celui du schéma que par une seule molécule de rhamnose.

Hisatsuka *et al.* (1971) montrent que les rhamnolipides créent une faible tension de surface, sont capables d'émulsifier les hydrocarbures et de stimuler la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur la source de carbone n-hexadécane.

Au contraire, un mutant de *Pseudomonas aeruginosa* ayant perdu la capacité de produire le tensioactif se multiplie peu sur l'hydrocarbure (Itoh & Suzuki, 1972). Si l'addition des rhamnolipides dans le milieu stimule la croissance du mutant de *Pseudomonas aeruginosa*, prouvant ainsi son rôle dans l'accessibilité aux molécules, ces mêmes tensioactifs, ajoutés dans le milieu de culture d'autres espèces bactériennes, n'entraînent pas par contre une telle stimulation. Le rôle des rhamnolipides s'avère donc très spécifique à *Pseudomonas aeruginosa*.

La production de rhamnolipides par *Pseudomonas* sp. MVB est favorisée lorsque le milieu est carencé en azote (Wagner *et al.*, 1983) et, dans ces conditions, 1,5 g de tensioactif est produit par gramme de biomasse sèche.

De telles quantités produites n'ont rien d'exceptionnel puisque Reiling *et al.* (1986) ont observé la production de 2,25 g/l de surfactant par *Pseudomonas aeruginosa* dans un fermenteur de 50 litres dont la source de carbone est le glucose (30 g/l).

Les rhamnolipides purifiés présentent une tension de surface très faible contre le n-hexadécane (1 mN/m) et une concentration de micellisation comprise entre 10 et 30 mg/l.

2.7.1.2. Les acides gras

Les microorganismes sont capables de produire et d'excréter des acides gras par :

- . biosynthèse à l'aide de l'acétyl CoA et de la malonyl CoA
- . hydrolyse des esters
- . oxydation (cas le plus fréquent) des alcanes et alcools (cf. 2.3.1.1.1.). Rehm & Reiff (1981) ont publié une liste détaillée des acides gras résultant de l'oxydation des alcanes.

Les propriétés des acides gras dépendent de la longueur de la chaîne hydrocarbonée. L'observation a d'ailleurs montré que les acides gras ayant la tension de surface la plus élevée ont entre 12 et 14 carbones.

En plus des acides gras linéaires, certaines bactéries produisent des acides gras complexes contenant des substituants hydroxylés et alkylés. C'est le cas des acides corynomycoliques (cf. 2.7.1.1.1.) qui sont de puissants surfactants relativement insensibles aux variations de pH et à l'ionisation du milieu de culture (Cooper *et al.*, 1981 ; Kretschmer *et al.*, 1982).

2.7.1.3. Les phospholipides

Les phospholipides sont les composants fondamentaux qui constituent la membrane bactérienne. Ils sont formés d'une molécule de glycérol liée par déshydratation à deux acides gras et un acide phosphorique (Figure 80).

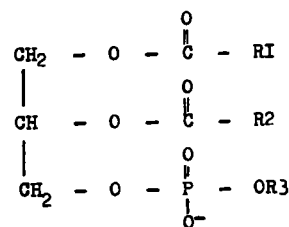


Figure 80 : Formule générale des glycérophospholipides. R1 et R2 sont les chaînes hydrocarbonées d'acides gras. R3 correspond par exemple à l'éthanolamine pour le phosphatidyléthanolamine.

Le taux de phospholipides croît considérablement dans le milieu de culture lorsque certaines bactéries (Makula *et al.*, 1975 ; Vachon *et al.*, 1982) ou levures (Hug *et al.*, 1974 ; Mishima *et al.*, 1977) utilisent des alcanes comme substrat. Cependant, il est difficile de savoir si ces molécules sont excrétées par un mécanisme cellulaire ou libérées post-mortem par lyse de la cellule ou fragmentation des membranes.

A titre d'exemple, il a été observé que *Acinetobacter* sp. HOIN croissant sur hexadécane produit dans le milieu le surfactant phosphatidyléthanolamine qui est capable de former des microémulsions dans l'eau avec les alcanes (Käppeli & Finnerty, 1979 et 1980).

Il a été observé aussi que les phospholipides produits par *Thiobacillus thiooxidans* correspondaient à des agents mouillants de molécules soufrées (Shively & Benson, 1967 ; Beebe & Umbreit, 1971).

2.7.1.4. Les antibiotiques

Les antibiotiques, molécules de faible poids moléculaire, produites par des bactéries ou des levures, sont capables d'inhiber la croissance d'autres microorganismes de manière sélective.

Les antibiotiques présentés ci-après agissent comme des agents de surface et sont à ce titre répertoriés dans ce chapitre.

2.7.1.4.1. La Gramicidine S

La Gramicidine S est un antibiotique décapeptidique cyclosymétrique (Figure 81). Sa synthèse est commune chez la plupart, sinon tous les membres de genre *Bacillus* durant les premières étapes de la sporulation (Katz & Demain, 1977).

Cet antibiotique peut se lier fortement avec des polyanions (polyphosphates...) conférant à l'ensemble des propriétés lipophiles. Ainsi deux molécules de Gramicidine S forment un complexe stable avec une molécule d'ATP (Krauss & Chan, 1983), les parties apolaires étant dirigées vers l'extérieur du complexe.

Inversement, la Gramicidine S peut former un complexe avec les hydrocarbures, les parties polaires de la Gramicidine S étant alors dirigées vers l'extérieur.

2.7.1.4.2. Les polymyxines

Les polymyxines sont un groupe d'antibiotiques lipopeptidiques produits par *Bacillus polymyxa* (Figure 82) (Paulus, 1967) capables de solubiliser certaines enzymes de membranes bactériennes (Balakrishnan *et al.*, 1980).

La chaîne hydrocarbonée de l'acide gras représente le groupement lipophile des polymyxines. Cette structure donne à ce groupe d'antibiotiques les propriétés de tensioactif capable de solubiliser les hydrocarbures.

2.7.1.4.3. La Surfactine (Subtilysine)

La Surfactine est un antibiotique lipopeptidique cyclique produit par *Bacillus subtilis* dont la structure (Figure 83) lui confère les propriétés de tensioactif (Arima *et al.*, 1968, Bernheimer & Avigad, 1970).

Bacillus licheniformis JF-2, dans un milieu glucose enrichi en extrait de levure et en nitrate, produit un tensioactif anionique similaire à la surfactine produite par *Bacillus subtilis* (Javaheri *et al.*, 1985). Les propriétés de ce tensioactif capable de solubiliser les hydrocarbures ne sont pas affectées par les variations de pH, de température, de salinité et de concentration de calcium.

La concentration critique de micellisation de la surfactine dans l'eau est de 25 mg/l et sa tension de surface est de 27 mN/m.

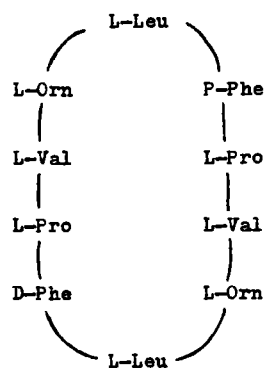


Figure 81 : Formule de la Gramicidine S cyclo-(leucyl-phénylalaniyl-prolyl-valyl-ornithine)₂.

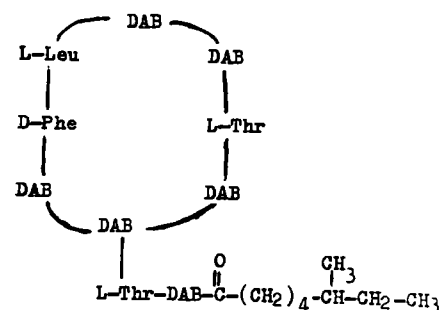


Figure 82 : Lapolymyxine B est un décapeptide dans lequel 8 acides aminés forment un cycle. Un acide gras est connecté à l'acide 2,4-diaminobutyrique terminal.

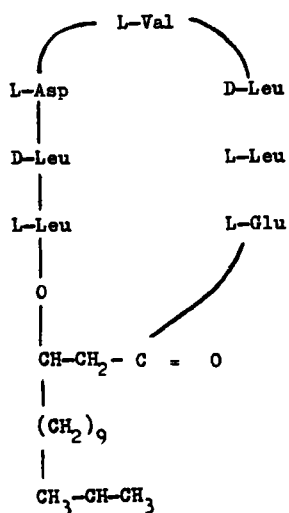


Figure 83 : Structure de la Surfactine.

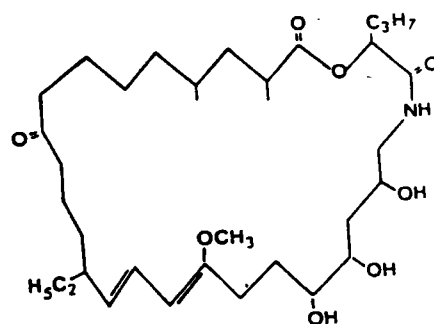


Figure 84 : Structure de l'antibiotique TA.

2.7.1.4.4. L'antibiotique TA

Cet antibiotique bactéricide est produit par *Myxococcus xanthus*. Il inhibe la synthèse de peptidoglycanes chez les bactéries en inhibant la polymérisation lipidique - disaccharidique - pentapeptidique (Figure 84) (Zafriri *et al.*, 1981).

Cette lactone cyclique partiellement polaire et partiellement lipophile possède les propriétés de tensioactif capable d'augmenter la solubilité des hydrocarbures dans l'eau.

2.7.1.5. Les Biopolymères

Les tensioactifs présentés dans les chapitres précédents avaient une structure bien définie et un poids moléculaire bien déterminé et peu élevé. Certaines bactéries, par contre, sont capables de produire des polymères de grande taille possédant les propriétés d'agent mouillant en présence de sources de carbone peu solubles dans l'eau.

2.7.1.5.1. Les biosurfactants de *Acinetobacter calcoaceticus*

Deux biopolymères ayant des propriétés efficaces de surfactants vis-à-vis des hydrocarbures dans l'eau ont été identifiés :

1. Un polysaccharide produit par *Acinetobacter calcoaceticus* souche RAG-1 constitué de N-acétyl-D-galactosamine, d'acide N-acétyl-galactosamine uronique et d'un sucre aminé N-acétylé non identifié.
2. Un polysaccharide produit par *Acinetobacter calcoaceticus* souche BD4 composé surtout de rhamnose.

* Le polysaccharide produit par *Acinetobacter calcoaceticus* souche RAG-1 est un polysaccharide anionique ayant un poids moléculaire de $9,8 \cdot 10^5$ (Zuckerberg *et al.*, 1979). Cet agent mouillant est efficace à très faible concentration (Reisfeld *et al.*, 1972). Ainsi le tensioactif n'agit pas sur les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques seuls.

Par contre, il agit sur tous les mélanges contenant des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (Rosenberg *et al.*, 1979). Le tensioactif stabilise l'émulsion en produisant des liaisons à l'interface hydrocarbure/eau formant un film de plus de 20 Å d'épaisseur (Zosim *et al.*, 1982) (Figure 85).

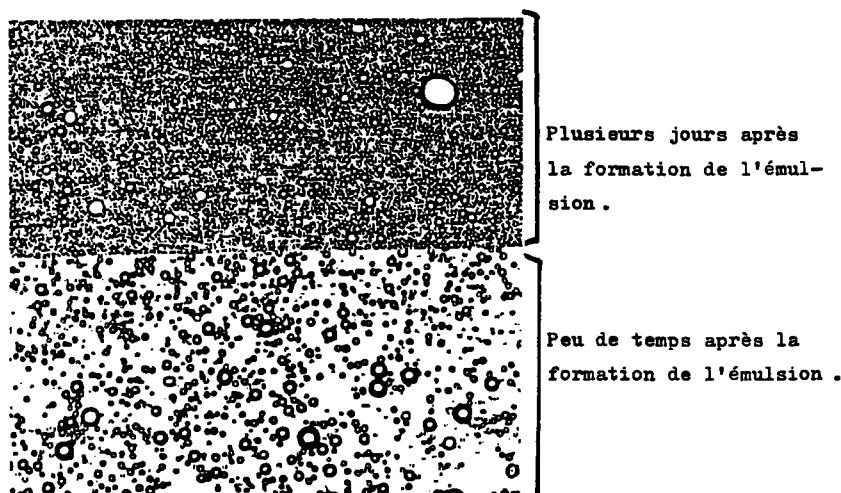


Figure 85 : Vue microscopique de l'émulsion hexadécane/eau stabilisée par 0,002% de biosurfactant (x390).

Acinetobacter calcoaceticus forme une émulsion stable avec l'hydrocarbure hexadécane et l'eau. Cette émulsion n'a ni les propriétés caractéristiques de l'hydrocarbure pure ni celles de la solution aqueuse contenant le tensioactif seul (Zosim *et al.*, 1982).

Le tensioactif stabilise donc les gouttelettes d'hydrocarbure. L'hétéropolysaccharide anionique se lie avec des quantités considérables d'eau et ensemble ils empêchent la fusion des gouttelettes. Le fait que la surface externe des gouttelettes devienne hydrophile explique l'action du tensioactif et sa propriété à réduire la viscosité des huiles lourdes (Basta, 1984).

Shoham & Rosenberg (1983) montrent que l'activité du tensioactif dépend directement de sa structure. Quand le poids moléculaire du tensioactif est réduit à 330 000, 125 000 et 62 000 en utilisant une dépolymérase spécifique, l'activité décroît respectivement de 25, 60 et 84%. De plus, l'utilisation de la dépolymérase a montré que *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 possédait d'autres structures capables de se comporter comme tensioactif.

En effet, après avoir dégradé le biopolymère en ajoutant dans le milieu de culture l'enzyme dépolymérase spécifique, il s'est avéré que les cellules adhéraient beaucoup mieux aux hydrocarbures que dans le milieu non traité avec la dépolymérase (Pines & Gutnick, 1984) (Shoham *et al.*, 1983). D'ailleurs cette observation est à corréliser avec l'étude d'un mutant d'*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 incapable d'excréter dans le milieu de culture le biopolymère osidique et dont les cellules présentent un pouvoir similaire d'adhésion aux hydrocarbures (Rosenberg *et al.*, 1983).

Acinetobacter calcoaceticus RAG-1 possède donc plusieurs structures capables de se comporter en agent mouillant, les structures de la surface cellulaire étant habituellement masquées par le biopolymère osidique.

* *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 produit un polysaccharide composé surtout de rhamnose et qui semble s'organiser autour de la cellule sous forme d'une capsule (Kaplan & Rosenberg, 1982). Cette capsule polysaccharidique isolée artificiellement ne présente aucune activité émulsifiante. Cependant, lorsqu'elle est isolée avec les protéines, le mélange devient un puissant agent mouillant des hydrocarbures dans l'eau (Juni & Janik, 1969).

En fait, huit autres souches d'*Acinetobacter calcoaceticus* produisent des agents mouillants. Par analogie à *Acinetobacter calcoaceticus* souches RAG-1 et BD4, l'activité émulsifiante semble produite par des protéines et des polysaccharides.

2.7.1.5.2. Autres biopolymères bactériens

Les autres biopolymères bactériens utilisés présentent des analogies avec ceux de l'espèce *Acinetobacter calcoaceticus*. En effet, les tensioactifs correspondent généralement à des structures complexes à base de protéines et de polysaccharides.

Les souches suivantes ont été étudiées :

1. *Pseudomonas aeruginosa* souche S7B₁
2. *Pseudomonas* souche PG-1
3. *Phormidium* souche J-1 (ATCC 39161)
4. *Arthrobacter* sp.

* *Pseudomonas aeruginosa* souche S7B₁ excrète dans le milieu de culture la protéine PA, agent mouillant d'hydrocarbures, lors de sa croissance sur n-alcane à longue chaîne carbonée (1-hexadécane) mais pas sur glucose, glycérol et acide palmitique. La protéine a un poids moléculaire de 14 300 et se compose surtout de sérine et thréonine (Hisatsuka *et al.*, 1971 ; Hisatsuka *et al.*, 1972).

* *Pseudomonas* souche PG-1 est une bactérie capable de dégrader les hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques. Le facteur de solubilisation des hydrocarbures est composé de protéines (34%), de sucres (16%) et de lipides (40%) (Reddy *et al.*, 1982 ; Reddy *et al.*, 1983).

* La Cyanobactérie filamenteuse *Phormidium* J-1 (ATCC 39161) produit un agent mouillant (Fattom & Shilo, 1984a ; Fattom & Shilo, 1985). Les cellules en phase de croissance ont une surface cellulaire hautement hydrophobe. Au-delà de cette phase, elles perdent partiellement leur hydrophobicité (Fattom & Shilo, 1984b).

Ce changement est corrélé avec la production d'un agent mouillant qui masque les sites hydrophobes. Cet agent est éliminé quand les bactéries se retrouvent dans un milieu favorable à leur croissance. Ce composé a un poids moléculaire supérieur à 100 000 et contient des sucres, des protéines et des esters d'acides gras.

* *Arthrobacter* sp. produit un polymère neutre extracellulaire, extrêmement visqueux, dépendant de la présence de sucrose dans le milieu de culture pour sa production. Ce polymère composé de D-fructose est sensible à la température, au pH acide et semble être hautement ramifié et dégradable en fermenteur (Bodie *et al.*, 1985).

2.7.1.6. Les microorganismes ayant une surface cellulaire hautement hydrophobe

Un grand nombre de microorganismes différents, capables ou non de dégrader les hydrocarbures, se comporte en surfactants, c'est-à-dire que ces microorganismes ont une forte affinité pour les interfaces hydrocarbures/eau (Fattom & Shilo, 1984a ; Rosenberg, 1984). L'hydrophobicité de la surface cellulaire a été mesurée à l'aide de nombreuses techniques :

- . Le procédé chromatographique HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) basé sur les interactions entre les groupements d'un gel non polaire et les zones non polaires de la structure étudiée (Smyth *et al.*, 1978).
- . Le procédé d'adhésion des bactéries aux hydrocarbures liquides (Rosenberg *et al.*, 1980).
- . Le test d'agrégation des cellules dans un milieu carencé en sels minéraux (Lindahl *et al.*, 1981).
- . Le test d'adhérence sur des surfaces solides (Gerson & Akit, 1980).
- . Le test de liaison avec l'acide dodécanoïque marqué (Kjelleberg *et al.*, 1980).
- . Le procédé de mesure des angles de contact entre les différentes phases (Gerson & Akit, 1980).
- . Le procédé de séparation de phases (Gerson & Akit, 1980).
- . L'observation de la formation de l'émulsion du kérosène dans l'eau, la dégradation de cette émulsion et les variations de tension de surface qui s'ensuivent (Neufeld & Zajic, 1984).

Les composés de surface cellulaire qui contribuent à l'hydrophobicité sont les suivants :

- . La protéine M et l'acide lipotéichoïque chez le groupe A des streptocoques (Miorner *et al.*, 1983 ; Ofek *et al.*, 1983).
- . La protéine A de *Staphylococcus aureus* (Jonsson & Wadstrom, 1983, 1984) et de *Aeromonas salmonicida* (Parker & Munn, 1984).
- . Une protéine non identifiée chez *Vibrio proteolytica* (Paul & Jeffrey, 1985).
- . Les minces *fimbriae* de *Alcaligenes calcoaceticus* RAG-1 (Rosenberg *et al.*, 1982).
- . La prodigiosine des espèces pigmentées de *Serratia* (Blanchard & Syzdek, 1978).

Inversement, l'adhésion à des surfaces hydrophobes peut être bloquée par les composés suivants :

- . La capsule d'acide hyaluronique de *Streptococcus pyogenes* (Ofek *et al.*, 1983).
- . La capsule de rhamnose de *Alcaligenes calcoaceticus* BD4 (Rosenberg *et al.*, 1983).

Au terme de cette étude, il apparaît qu'il est probable que la plupart, sinon toutes les bactéries pouvant utiliser des hydrocarbures comme source de carbone, sont capables de produire des tensioactifs et d'utiliser leur propriété pour avoir accès plus facilement à la source de carbone.

En pratique, la présence de tensioactifs dans le milieu de culture aboutit à l'observation de variations des concentrations en hydrocarbures "solubilisés" dans l'eau et ceci en fonction de la phase de croissance de la population bactérienne et de la demande en source de carbone de cette population.

Une analyse approfondie du milieu de culture (par spectrométrie de masse par exemple) peut permettre de mettre en évidence les tensioactifs synthétisés par les bactéries utilisées lors de l'étude de la dégradation d'un hydrocarbure.

2.7.2. LES TENSIOACTIFS DE SYNTHÈSE

Les tensioactifs de synthèse représentent un marché de la chimie organique tout à fait considérable. Leur usage principal est basé sur leur pouvoir de solubilisation et, de ce fait, ils sont utilisés comme détergents. Les tensioactifs de synthèse sont donc retrouvés dans les savons, les poudres à laver, les produits d'entretien... Les dispersants chimiques sont aussi utilisés pour réduire les pollutions pétrolières, en particulier depuis la catastrophe écologique du Torrey Canyon.

Les tensioactifs de synthèse doivent répondre à trois exigences :

- . ils doivent se comporter comme des détergents,
- . ils doivent être biodégradables,
- . ils ne doivent pas être toxiques.

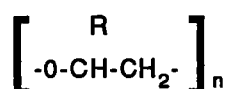
2.7.2.1. Action détergente

Cette action est intimement liée à la formulation des molécules. Elles doivent être constituées comme les tensioactifs bactériens d'un groupement hydrophobe, généralement une chaîne hydrocarbonée, et d'un groupement hydrophile qui permet la solubilisation dans l'eau.

Les surfactants de synthèse peuvent avoir des formulations très différentes comme l'indiquent les structures générales présentées ci-dessous :

. les alkylsulfates : $R - SO_4^-$

. les éthers d'alkylpolyoxyéthylène :



. les α -oléfine sulfonates : $^3OS-R-CH = CH_2$

. les alkylbenzène sulfonates : $^3OS-\text{C}_6\text{H}_4-R$

En fait, cette liste n'est pas exhaustive ; il existe de très nombreuses autres structures ayant une action détergente, comme par exemple un complexant macrocyclique capable de solubiliser dans l'eau certains hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ce complexant est constitué d'une structure hydrocarbonée hydrophobe circulaire, capable de piéger des hydrocarbures, liée à des structures ammonium dirigées vers l'extérieur et conférant à l'ensemble la propriété d'être soluble dans l'eau (Diederich & Dick, 1984 ; Diederich & Griebel, 1984) (Figure 86).

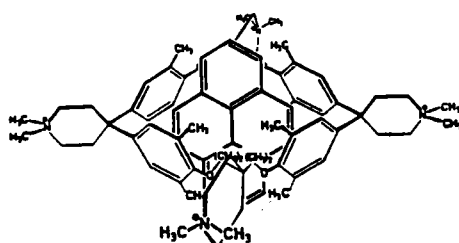


Figure 86 : Complexation du pyrène par un complexant macrocyclique de synthèse.

D'autres hydrocarbures peuvent être solubilisés par cette méthode (perylène, fluoranthène, naphthalène). La structure du complexe reste similaire à celle de la figure 86, les parties polaires du complexe étant dirigées vers l'extérieur.

D'autre part, il faut signaler que la formulation de nombreux tensioactifs (en particulier les dispersants pétroliers) n'est pas connue pour des raisons de secret de synthèse et leur nom n'apporte aucun renseignement (Corexit, Gamlen Sea Clean...).

2.7.2.2. Biodégradabilité des tensioactifs de synthèse

L'étude de la biodégradabilité des tensioactifs de synthèse s'effectue en trois étapes. Dans un premier temps, il est nécessaire de montrer que le dispersant est dégradé ou non par les organismes qui ont été choisis pour l'étude. Ensuite, il faut étudier le comportement des mêmes organismes en présence de la source de carbone hydrophobe seule (hydrocarbures, pétrole brut, huiles...) et enfin, dans un troisième temps, en présence de la source de carbone dispersée par le tensioactif de synthèse.

Le tableau 2 ci-après présente les résultats obtenus dans certains laboratoires.

De manière générale, les dispersants de synthèse sont biodégradables, mais leur disparition reste assez lente.

Les travaux de Mulkins-Phillips & Stewart (1974) et de Liu (1983) montrent que les mélanges dispersant + pétrole brut présentent un taux de biodégradation plus élevé que le dispersant ou le pétrole brut seul pour les microorganismes choisis.

Cependant, en présence des mélanges, des variations qualitatives de populations sont observées. Mais de tels résultats dépendent du choix des microorganismes puisque les travaux de Bhosle & Row (1983) présentent les conclusions inverses : les dispersants seuls, en présence de pétrole brut, supportent la croissance bactérienne. De manière plus précise, Foght & Westlake (1982) montrent que les dispersants interviennent de façon différente sur plusieurs types d'hydrocarbures. Ainsi, en présence du dispersant Corexit 9527, les composés aromatiques sont dégradés plus rapidement que les n-alcanes dans le mélange complexe d'une huile.

2.7.2.3. Toxicité des tensioactifs de synthèse

L'utilisation d'un tensioactif dans l'étude de la biodégradation d'un insoluble devient possible lorsque la toxicité [tensioactif + produit] est moindre à court ou à long terme, que celle du produit seul. La toxicité du dispersant seul n'est pas un facteur interdisant son utilisation.

Le tableau 2 montre que d'une manière générale, les tensioactifs de synthèse peuvent être biotransformés par les bactéries. S'ils sont toxiques, leur toxicité s'atténue avec le temps.

En fait, l'étude de leur toxicité n'a jamais été menée sur un écosystème. Si le Corexit 9527 n'est pas toxique pour les bactéries, sa toxicité a été étudiée chez les protozoaires et déterminée sur la base du taux de croissance (Rogerson & Berger, 1981).

Il s'est avéré que le pétrole brut seul est moins toxique que l'émulsion car celle-ci pénètre dans la cellule qui est alors inhibée.

La dose létale 50 (DL50) chez le poisson Medaka a été étudiée pour les détergents d'usage domestique (alkylsulfates, éthers d'alkylpolyoxyéthylène, alkylbenzène sulfonates...) (Kikuchi & Wakabayashi, 1984). Cette étude a montré que la toxicité dépendait de la structure chimique du

Tableau 2 : Etude de la dégradation de différents surfactants, en présence de différents microorganismes, avec ou sans pétrole brut.

+ peu biodégradable
 ++ moyennement biodégradable
 +++ biodégradable
 N non biodégradable
 - non étudié.

Auteurs	Organisme	Tensioactif		Source de carbone		Dégradabilité de la source de carbone dispersée avec le surfactant
		Nom	Dégradabilité	Nom	Dégradabilité	
Mulkins-Phillips & Stewart, 1974	Bactéries provenant d'échantillons d'eau de mer	Corexit 8666	++	Pétrole brut	++	+++
		Gamlen Sea Clean	+			+++
		G.H Woods Degreaser Formula 11470	+			+++
		Sugee 2	++			+++
Liu, 1983	Bactéries capables de dégrader le pétrole	Magnus 101	++	Pétrole brut	++	-
		BP 1100X	++			+++
		BP1100	+			-
		Linco n° 4	+			-
		Corexit 8666	+			+++
Una & Garcia, 1983	<i>Aeromonas sp.</i>	tween 20	+++	-	-	-
		tween 80	+++			-
		tween 85	+++			-
		Corexit 7664	++			-
		Span 65	++			-
		Span 80	+			-
Bhosle & Row, 1983	population bactérienne de sédiments marins	IB1/80	++	Pétrole brut	N	+
		IB2/80	N			N
		IB11/80	++			+
		IB12/80	++			+
		IB13/80	++			+
		BP 1100WD	++			+
		BP1100X	++			+
Kikuchi, 1985	microorganismes d'échantillons de la rivière Tama (Japon)	alkylsulfate	+++	-	-	-
		éthers d'alkylpolyoxyéthylène	+++			-
		alkylbenzène sulfonates linéaires	+			-
		éthers d'alkylphénylpolyoxyéthylène	+			-
		alkylpolyoxyéthylène sulfate	++			-
		-oléfine sulfonates	++			-

tensioactif. En effet, la toxicité augmente avec la longueur des chaînes hydrocarbonées ou poly-oxyéthyléniques.

En ce qui concerne la toxicité des tensioactifs de synthèse, il existe actuellement peu d'études approfondies sur leur impact dans des écosystèmes très différents comme le milieu marin ou le milieu d'eaux douces.

Dans le cadre de l'étude de la biodégradation d'un hydrocarbure, un tensioactif de synthèse peut être utilisé pour augmenter la solubilité de l'hydrocarbure dans l'eau. Il doit répondre aux quatre critères suivants :

- . le tensioactif doit être capable de solubiliser l'hydrocarbure étudié,
- . le tensioactif doit être aussi spécifique que possible car un hydrocarbure est rarement pur. Le tensioactif idéal doit solubiliser l'hydrocarbure étudié, tout en ne solubilisant pas ses impuretés,
- . le tensioactif ne doit pas être biodégradable, il ne doit pas servir de source de carbone à la place de l'hydrocarbure,
- . le tensioactif ne doit pas être toxique.

2.7.3. SOLUBILISATION DES HYDROCARBURES PAR VOIE CHIMIQUE

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques possèdent la particularité d'être hydrophobes et donc difficiles d'accès en tant que source de carbone pour la bactérie. Ce problème, s'il peut être résolu par l'ajout de surfactants chimiques ou produits par les bactéries elles-mêmes, peut être supprimé par voie chimique. Il suffit pour cela de greffer sur l'hydrocarbure un groupement hydrophile.

La technique de sulfonation a été retenue pour solubiliser le carbazole dans l'eau parce qu'il est relativement facile de mener cette réaction de substitution sur une structure aromatique et les produits obtenus sont extrêmement solubles dans l'eau.

2.7.3.1. La chimie de la sulfonation

Cerfontain (1985) montre que la réaction de sulfonation des hydrocarbures aromatiques n'est pas aussi simple que la réaction présentée dans la plupart des livres de chimie organique le laisse supposer (Figure 87).

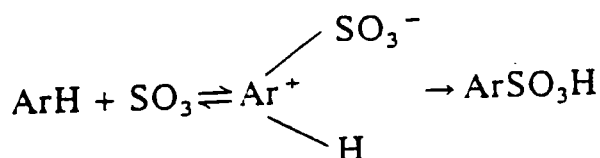
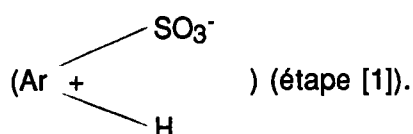


Figure 87 : Sulfonation des hydrocarbures aromatiques par le réactif de base SO_3 en milieu aprotique (nitrométhane ou dioxane).

En fait, les réactions de sulfonation peuvent présenter jusqu'à dix étapes différentes, certaines étant plus ou moins importantes en fonction des concentrations en réactifs (Figure 88).

La réaction de sulfonation nécessite la formation d'un complexe σ



La position de réaction de sulfonation sur un hydrocarbure aromatique est déterminée par la position des sites d'énergie relative capables de supporter la formation du complexe σ et par l'encombrement stérique.

Il peut y avoir une réaction de polysulfonation à condition que d'autres sites soient capables de supporter la formation du complexe σ , que les effets électroniques des groupements sulfoniques déjà fixés le permettent et que l'encombrement stérique ne soit pas trop important (Cerfontain, 1985).

Un second complexe (étape [2]) peut être formé par réaction du complexe σ avec le réactif. Le taux de formation de ce second complexe catalyse en grande partie les huit autres réactions (étapes [3] à [10]).

Le produit de sulfonation primaire (étape [3]) est un acide pyrosulfonique qui peut être dissocié en son anhydride sulfonique correspondant et en acide disulfurique (équilibre [4]). Par exemple, lors de la sulfonation du p-dichlorobenzène avec SO_3 dans le solvant CCl_3F , un précipité équimoléculaire d'anhydride 2,5-dichlorobenzène sulfonique et d'acide disulfonique est obtenu (Bosscher & Cerfontain, 1968).

Quand le rapport initial des réactifs $[\text{ArH}] / [\text{SO}_3]$ est $> 0,5$, des réactions secondaires de sulfonation ont été observées (étapes [5] et [6]) entre l'hydrocarbure aromatique et les acides pyrosulfoniques et disulfuriques (Koeberg-Telder & Cerfontain, 1971).

Les étapes [7] à [10] montrent que le complexe σ aboutit à la formation d'acides arènesulfoniques par réaction avec les produits obtenus lors des étapes [3], [4], [5] et [6]. Un résumé des différentes réactions de sulfonation est présenté dans la figure 89.

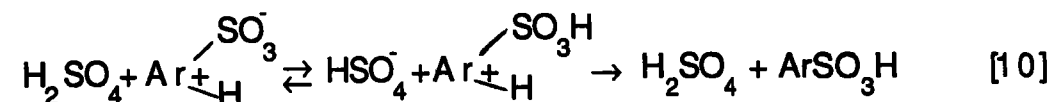
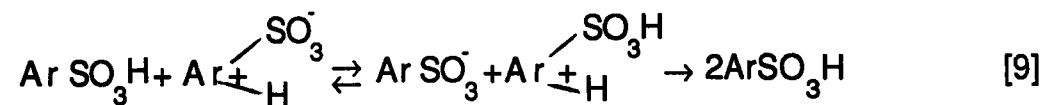
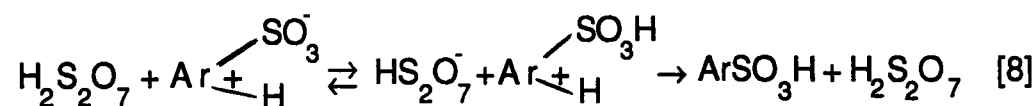
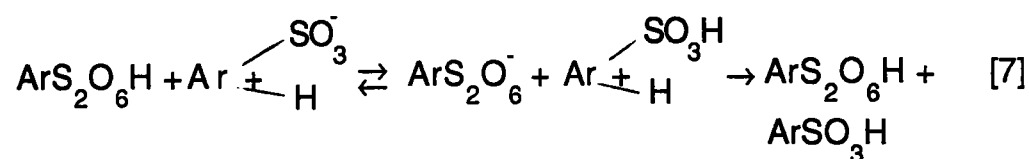
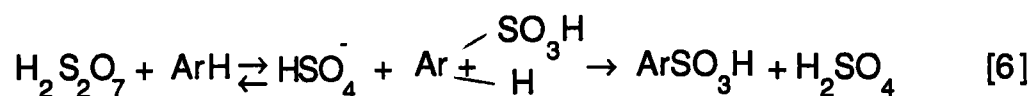
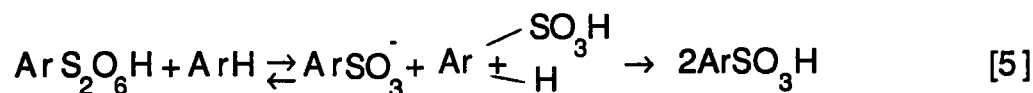
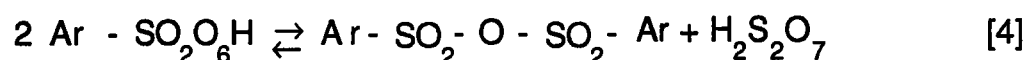
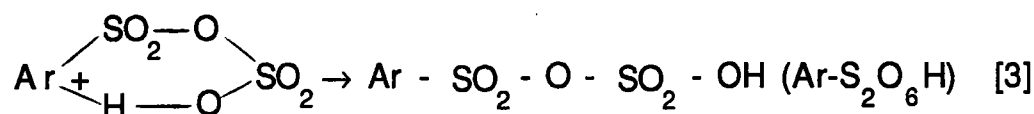
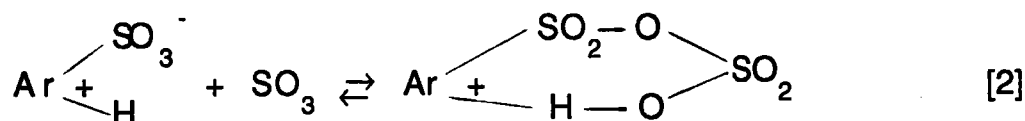
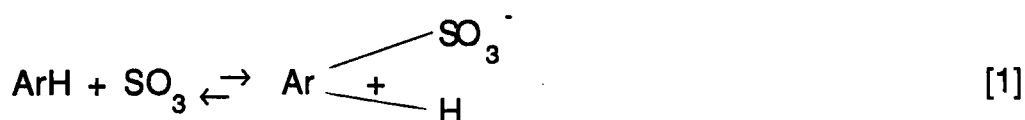


Figure 88 : Réaction de sulfonation d'un composé aromatique en milieu aprotique.

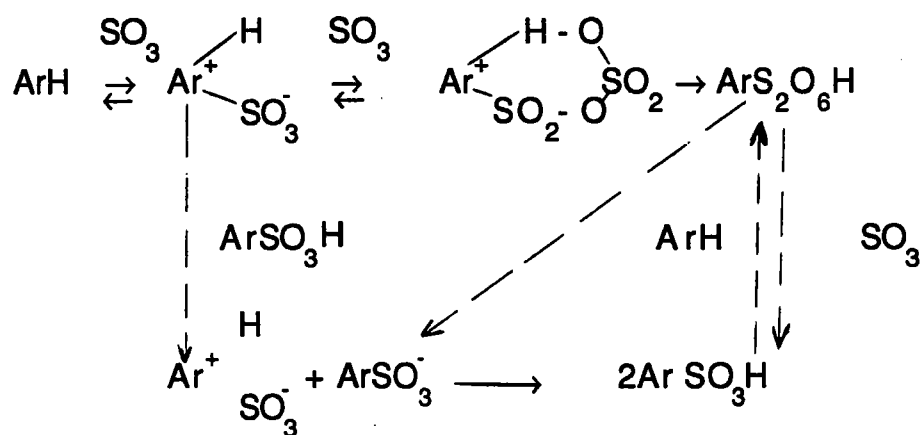


Figure 89 : Réactions de sulfonation des hydrocarbures aromatiques dans un solvant aprotique.

sulfonation primaire _____

sulfonation secondaire -----

Dans la chimie de la sulfonation des hydrocarbures aromatiques, des réactions tout à fait particulières ont été observées.

. Le remplacement de substituants autres que l'hydrogène a été observé. Ces réactions correspondent en général à un mécanisme d'addition et d'élimination de substituant via la formation d'un complexe σ (Figure 90).

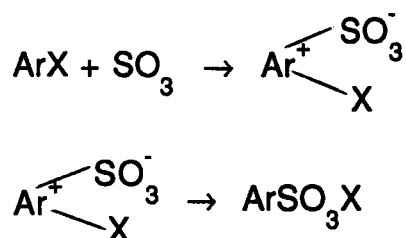


Figure 90 : Certaines réactions de substitution peuvent conduire au remplacement d'autres substituants que l'hydrogène.

Ces réactions sont appelées "Ipso sulfonation" et ont permis d'observer la déiodonation du 2- et du 4-iodotoluène ainsi que des déméthylations.

. Il peut y avoir des réactions de sulfonation sur certains substituants hydrocarbonés d'hydrocarbures aromatiques. Ces réactions ont été observées surtout avec les hydrocarbures du type 9 - alkylanthracène (Figure 91).

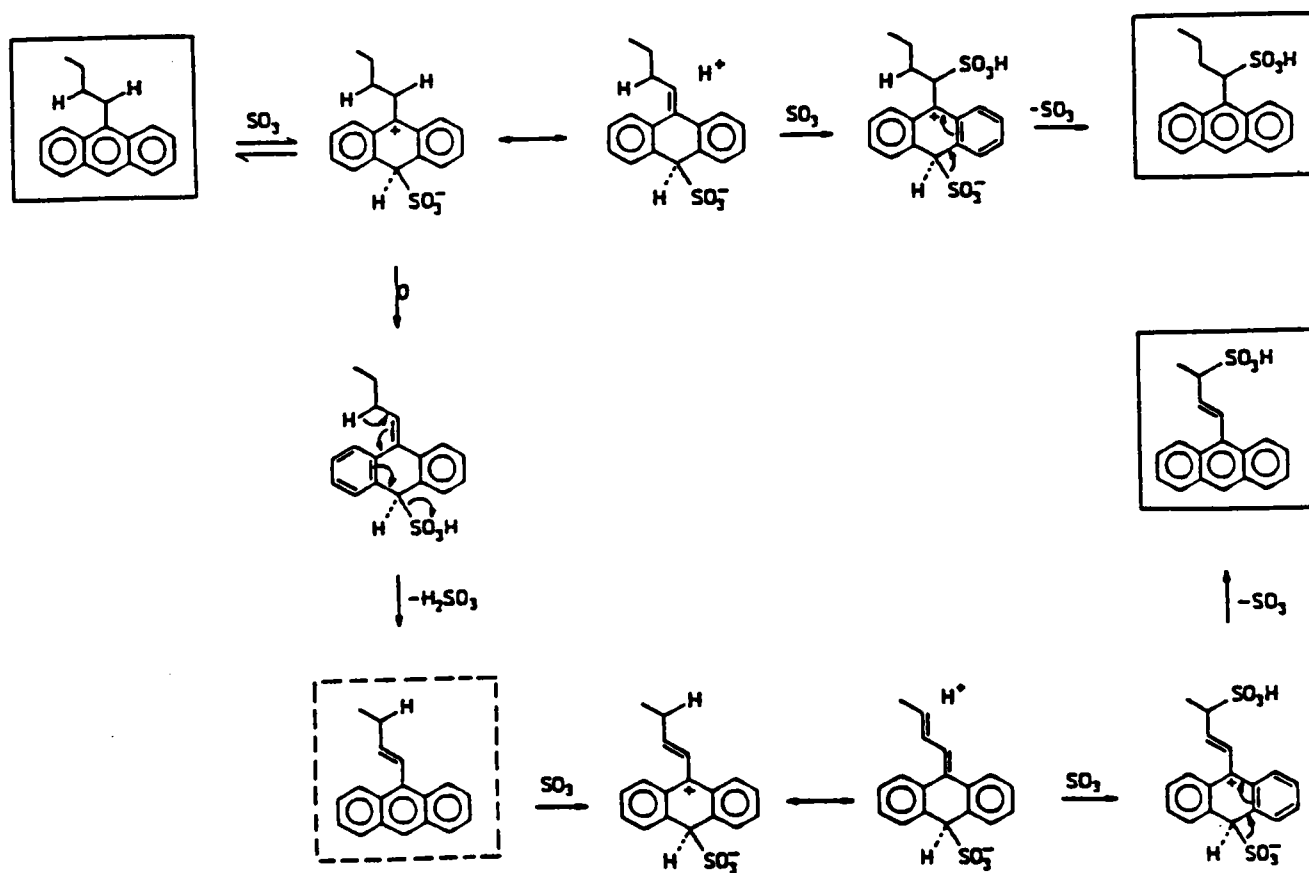


Figure 91 : Réaction de substitution sur le substituant du 9 - butylanthracène (Cerfontain, 1985).

. La réaction de sulfonation peut être compliquée par la formation de diarylsulfone. Pour le benzène, en présence de SO_2 ou de CHCl_3 comme solvant, le taux de diarylsulfone est $< 5\%$, mais il peut être de 23% en absence de solvant. La formation des diarylsulfones suit le mécanisme présenté sur la figure 92.

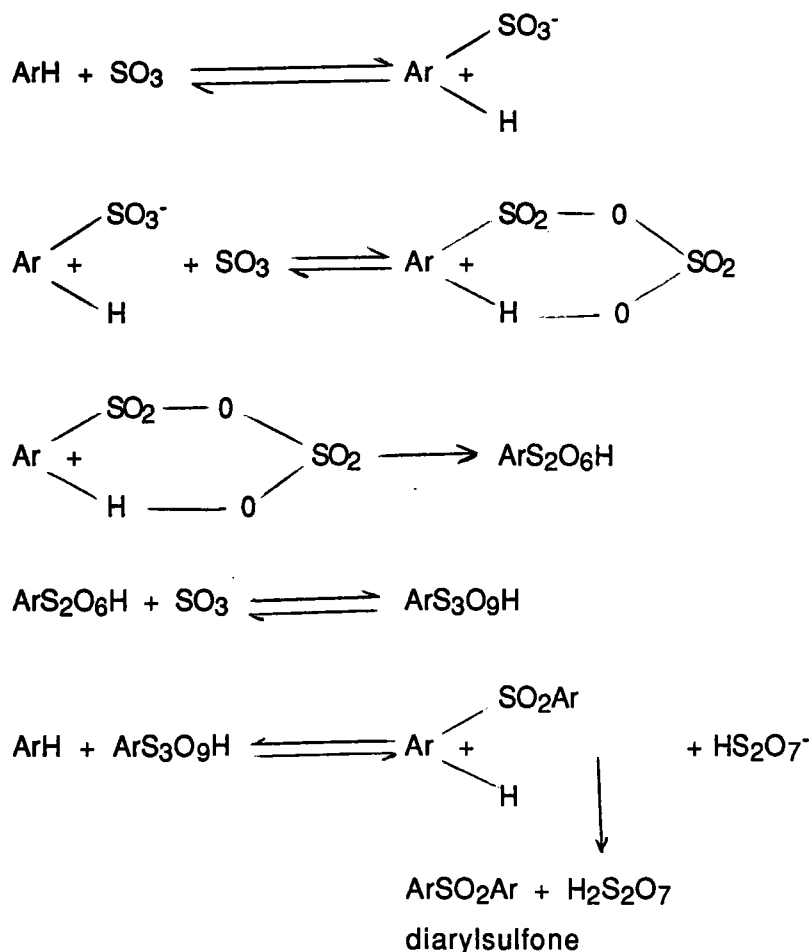


Figure 92 : Formation de diarylsulfone (Cerfontain, 1985).

La formation des diarylsulfones débute par la réaction habituelle de formation du complexe σ et de l'acide pyrosulfonique. L'acide pyrosulfonique, après une sulfonation supplémentaire, réagit avec un second hydrocarbure aromatique pour former un nouveau complexe σ qui, après réarrangement, aboutit à la formation de diarylsulfone.

Comme nous le voyons, la réaction chimique de sulfonation n'est pas une réaction spécifique, mais aboutit généralement à la production d'un mélange de produits sulfonés. De ce fait, des méthodes d'analyses et de séparations doivent être utilisées.

La chromatographie liquide sous faible pression permet d'étudier la séparation des produits de sulfonation de l'anthracène (Obruka *et al.*, 1976), la chromatographie liquide avec détecteur U.V., celle des alkylsulfonates (Kraslawski & Kulawinek, 1983), la chromatographie HPLC, celle des produits de sulfonation du 2-aminonaphtalène.

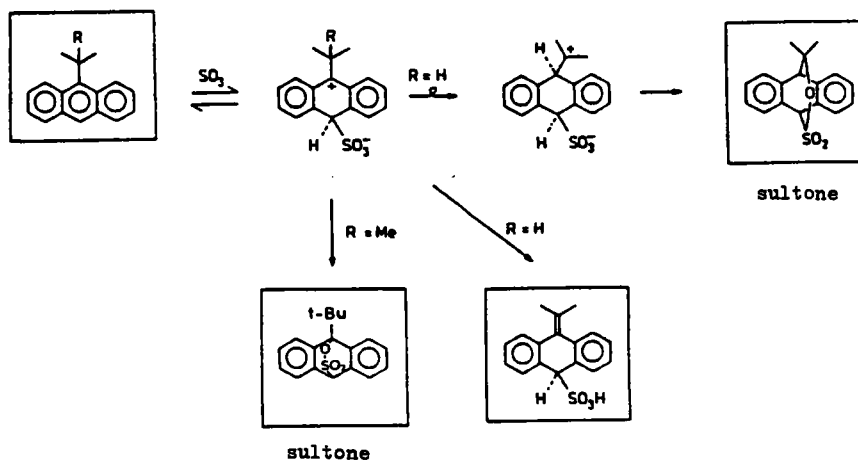


Figure 93 : Formation de sultone après réaction avec le 9 - isopropyl (R=H) et le 9 - tert-butyl (R=CH₃) anthracène (Cerfontain, 1985).

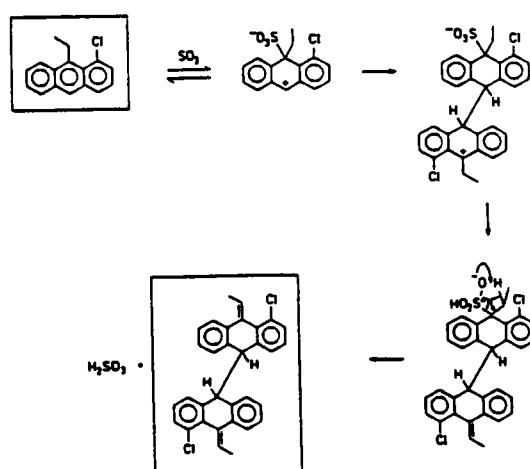


Figure 94 : Formation du bi (1- chloro - 9 - éthylidène - 9,10 - dihydro - 10 - anthryl) à partir du 1-chloro - 9 - éthylantracène (Cerfontain, 1985).

Cependant, il semble bien que les résines Amberlite XAD soient les phases les plus efficaces pour effectuer la séparation des acides sulfoniques (Scoggins & Miller, 1968 ; Pietrzyk & Chu, 1977a ; Pietrzyk & Chu, 1977b ; Pietrzyk & Stodola, 1981).

. Le complexe σ formé lors d'une sulfonation peut amener à la formation de sultones et de structures insaturées (Figure 93).

Les déplacements de la charge positive du complexe σ dans certaines molécules (en particulier les dérivés de l'anthracène) peut aboutir à la formation de structures pontées avec le groupement sulfonate appelées : sultone.

. La réaction de sulfonation peut mener à la formation de dimère (Figure 94).

Comme pour le cas précédent, le complexe σ formé lors de la réaction de sulfonation aboutit à de nouvelles structures. La formation du dimère se caractérise par la libération d'acide sulfonique H_2SO_3 .

2.7.3.2. Sulfonation du carbazole

La sulfonation du carbazole est une réaction simple qui s'effectue avec l'acide chlorosulfonique ($\text{HO SO}_2 \text{Cl}$), mais qui peut mener à la formation de cinq produits différents selon le solvant, les conditions de température, les rapports molaires des réactifs et le catalyseur qui ont été retenus (Figure 95).

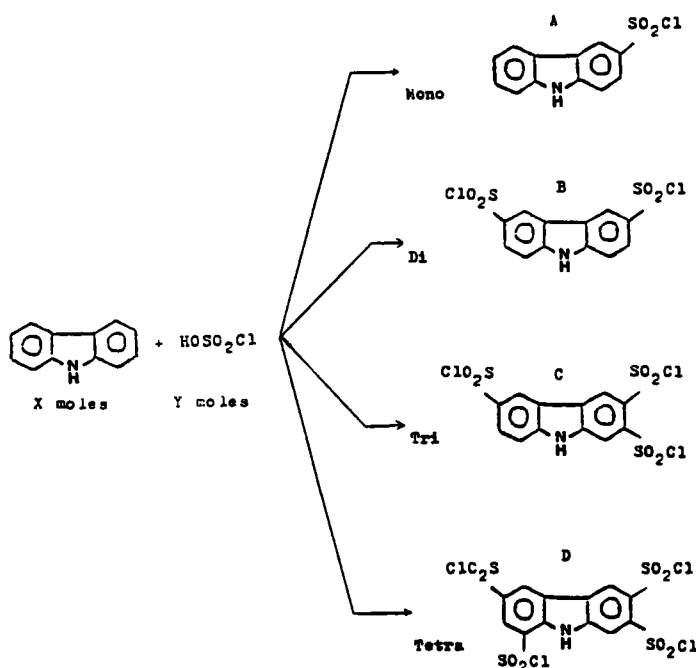


Figure 95 : Réaction de chlorosulfonation du carbazole.

La réaction de chlorosulfonation aboutit à la production de monochlorosulfocarbazole (A), de dichlorosulfocarbazole (B), de trichlorosulfocarbazole (C) et de tétrachlorosulfocarbazole (D), et ceci en fonction des conditions expérimentales.

Il faut signaler que, généralement, la réaction mène à l'obtention d'un mélange de produits qui, en présence d'eau, sont hydrolysés en acides sulfoniques (Figure 96).

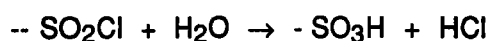


Figure 96 : Hydrolyse de produits de chlorosulfonation.

Borodkin (1950) a étudié la formation d'acide carbazole monosulfonique et disulfonique dans le nitrobenzène en faisant varier le rapport molaire OHSO_2Cl /carbazole, les conditions de température et la durée de réaction (Tableau 3).

Tableau 3 : Conditions de réaction de sulfonation du carbazole avec les rendements de formation d'acide carbazole sulfonique.

Quantité de carbazole (g)	Quantité d'acide chlorosulfonique moles/moles de carbazole	Température de réaction (°C)	Durée de la réaction (h)	Rendement (%) d'acide carbazole sulfonique	
				mono-	di
5	1	10 - 11	1	84,3	-
	3			-	95,6
	1			83,6	-
	3			-	95,3
10	1	15 - 17	3	82,8	-
	2			MELA NGE	
	3			-	96,4
	4			-	98,2
	6	28 - 30		-	70,8
	1			87,4	-
	2			MELA NGE	
	3			-	86,4
	4	-	84,6		

Le carbazole est ainsi dissous dans 15 à 18 fois son poids de nitrobenzène. La formation de l'acide carbazole monosulfonique peut être obtenue dans des conditions de température et de durée de réaction assez variées. Cependant, elle nécessite toujours de faire réagir le carbazole et l'acide chlorosulfonique dans des conditions équimolaires.

Lors de la réaction de chlorosulfonation du carbazole avec l'acide chlorosulfonique (Shishkina *et al.*, 1970), le choix du solvant est important. A chaque fois que le solvant CCl_4 est utilisé, la

réaction de chlorosulfonation du carbazole est obtenue, ce qui n'a jamais été le cas avec le dioxane et le nitrométhane.

Il semble que, dans la phase d'initiation de la réaction, la catalyse acide soit associée à une absorption de protons qui permet l'apparition des acides chlorosulfoniques.

Or, le dioxane et le nitrométhane sont des solvants possédant la propriété d'être accepteur de protons ; de ce fait, l'action catalytique de l'acide chlorosulfonique est réduite et la réaction peut être empêchée.

En présence du solvant CCl_4 , un mélange de carbazole di- et tri-chlorosulfonique semble être obtenu en faisant réagir jusqu'à 18 moles d'acide chlorosulfonique par mole de carbazole (Shishkina *et al.*, 1970). A partir de 25 moles d'acide par mole de carbazole, la réaction semble mener spécifiquement à la formation de l'acide carbazole trichlorosulfonique.

Des résultats similaires sont obtenus en présence du catalyseur P_2O_5 . Suivant les quantités de réactifs, le mélange d'acides di- et tri-chlorosulfoniques ou bien l'acide carbazole trichlorosulfonique seul est obtenu (Proshechkina *et al.*, 1969a).

L'évolution du mélange des acides carbazole di- et tri-chlorosulfoniques a été étudiée de façon approfondie dans les rapports molaires suivants (Proshechkina *et al.*, 1969b) :

$$8 \leq \text{HOSO}_2\text{Cl} / \text{P}_2\text{O}_5 \leq 18$$

$$1 \leq \text{P}_2\text{O}_5 / \text{carbazole} \leq 5$$

L'observation a montré que lorsque les rapports augmentaient, le taux d'acide carbazole di-chlorosulfonique diminuait de 87 à 0%, tandis que celui du carbazole trichlorosulfonique augmentait de 13 à 100%.

L'acide carbazole tétrachlorosulfonique a été obtenu avec un rendement de 100% en présence du catalyseur PCl_5 et en présence du solvant CCl_4 pour les rapports de réactifs suivants (Proshechkina *et al.*, 1969b) :

$$8 < \text{HOSO}_2\text{Cl} / \text{carbazole} < 18 \quad \text{PCl}_5 / \text{carbazole} = 3$$

ou bien

$$\text{HOSO}_2\text{Cl} / \text{carbazole} = 8 \quad 2,5 < \text{PCl}_5 / \text{carbazole} < 5$$

La réaction de sulfonation du carbazole semble à l'heure actuelle bien connue et ne présente pas de difficulté quand il s'agit d'obtenir un mélange de produits de sulfonation.

Par contre, l'obtention d'un seul produit de sulfonation (mono- ou di- ou tri- ou tétra-carbazole sulfonique) nécessite beaucoup de soins dans le choix :

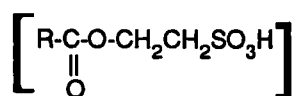
- des rapports molaires entre l'acide chlorosulfonique et le carbazole,
- du solvant,
- du catalyseur,

- de la température de la réaction,
- de la durée de la réaction.

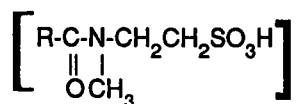
2.7.3.3. Biodégradation des hydrocarbures sulfonés

Les hydrocarbures sulfonés sont représentés surtout par la famille des alkylbenzènesulfonates qui sont utilisés comme détergents. Leur utilisation très importante implique une pollution des rivières non négligeable. C'est pourquoi leur assimilation par les bactéries a été étudiée ; Hrsak *et al.* (1982) ont observé la biodégradation d'alkylbenzènesulfonates linéaires commerciaux $[H_3OS - Ar - (CH_2)_n - CH_3]$ en culture continue avec une culture mixte constituée de 5 souches de *Pseudomonas sp.* 1 à *sp.* 5, avec une souche *Achromobacter* et une souche *Acinetobacter*.

Plus précisément Sawyer & Ryckman (1957) ont montré que les esters anioniques



et les amides anioniques



étaient rapidement dégradés.

D'autre part, ils ont observé que la dégradation des alkylbenzènesulfonates primaires

$[H_3OS-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2R]$ et secondaires $H_3OS-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}-\overset{R}{\text{R'}}$ est toujours complète, ce qui n'a jamais été

le cas des composés tertiaires $H_3OS-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{R''}{C}-R'$. Ils ont alors conclu que la biodégradation des al-

kylbenzènesulfonates débute par la chaîne hydrocarbonée et que, de ce fait, la dégradation dépend de la présence de microorganismes capables d'oxyder les groupements méthyl terminaux en acide carboxylique.

L'oxydation achevée, la chaîne hydrocarbonée peut être assimilée par les microorganismes par β -oxydation.

Toujours d'un point de vue structural, Swischer (1963) a montré que la biodégradation des alkylbenzènesulfonates est d'autant plus rapide que le groupement sulfonate est éloigné du site d'attaque enzymatique. Cependant, il a observé que ce phénomène était vrai pour les alkylbenzènesulfonates avec une chaîne linéaire hydrocarbonée ayant au plus douze carbones ; en effet, pour des chaînes plus longues, la vitesse de biodégradation diminue.

Finalement, Willetz & Cain (1972) proposent un mécanisme général de dégradation des alkylbenzènesulfonates par l'espèce *Bacillus* (Figure 97).

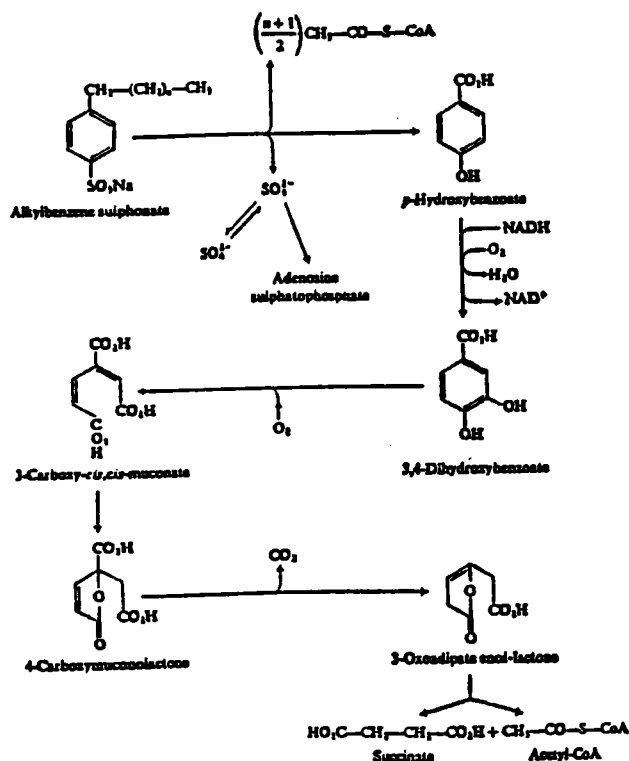


Figure 97 : Mécanisme de dégradation des alkylbenzènesulfonates par *Bacillus*.

La première phase du mécanisme de dégradation correspond à l'assimilation de la chaîne hydrocarbonée par β-oxydation comme l'avaient proposé Sawyer & Rickman (1957). La deuxième phase consiste en un remplacement du substituant sulfonate par un groupement hydroxylique, le groupement sulfonate étant intégré dans l'adénosine sulfatophosphate ou bien oxydé en sulfate. La dégradation du parahydroxybenzoate formé suit ensuite la voie normale de dégradation avec la formation du cis-diol et une ouverture du cycle en ortho pour aboutir à la production de succinate et d'acétyl-CoA.

Par contre, Bird & Cain (1974) proposent un mécanisme différent du précédent avec *Alcaligenes* souche 2d et comme source de carbone des alkylbenzènesulfonates ayant une chaîne hydrocarbonée de deux ou trois carbones (Figure 98).

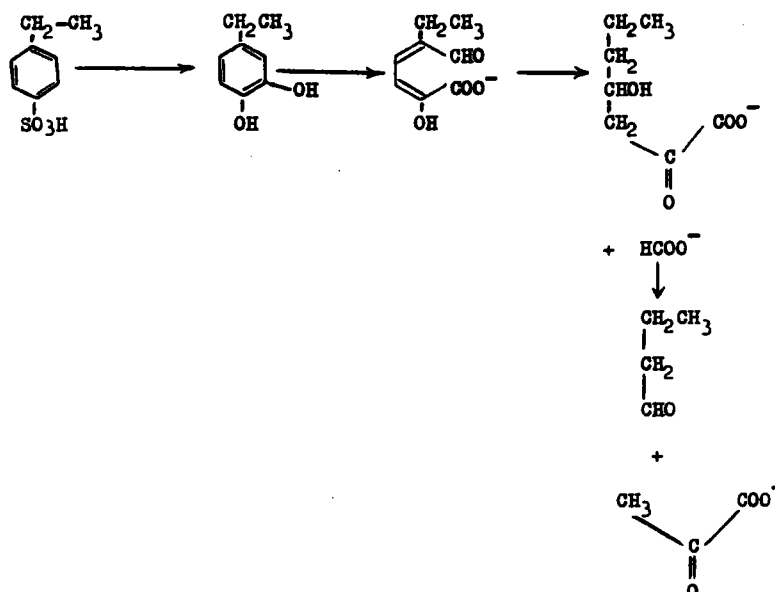


Figure 98 : Mécanisme de dégradation du phénylthane-parasulfonate par *Alcaligenes* souche 2d.

La différence entre ce mécanisme et celui de la figure 97 vient du fait que la chaîne hydrocarbonée ne subit aucune oxydation. Le noyau aromatique est oxydé en cis-diol après élimination du groupement sulfonate. *Alcaligenes* souche 2d assimile ensuite le butyraldéhyde et le pyruvate formé après méta-clivage du cycle.

Cain & Farr (1968) proposent un mécanisme de biodégradation de l'acide benzène sulfonique et toluène sulfonique par *Pseudomonas aeruginosa* identique au mécanisme de la figure 98 avec *Alcaligenes* souche 2d. Ils supposent qu'il y a libération d'acide sulfonique H_2SO_3 dans le milieu de culture. Endo *et al.* (1977) étudient la dégradation de l'acide benzène sulfonique et admettent le même mécanisme. Par contre, Focht & Williams (1970) ont proposé un mécanisme de dégradation de l'acide paratoluène sulfonique avec *Pseudomonas* légèrement différent des précédents dans le sens que l'hydroxylation du noyau aromatique est achevée avant l'élimination du substituant sulfonate (Figure 99).

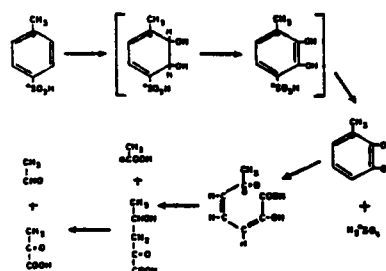


Figure 99 : Mécanisme de dégradation du paratoluène sulfonate par *Pseudomonas*.

Ce mécanisme semble montrer que l'hydroxylation du cycle aromatique est indépendante de la désulfonation qui se caractérise dans ce mécanisme par la production d'acide sulfurique.

Peu d'hydrocarbures aromatiques polycycliques sulfonates substitués ont été étudiés. Brilon *et al.* (1981a) ont montré que la souche *Pseudomonas sp.* A3 est capable de croître avec l'acide 1-

naphtalène sulfonate, tandis que la souche *Pseudomonas sp.* C22 utilise comme source de carbone l'acide 2-naphtalène sulfonate. Ils ont proposé le mécanisme suivant (Brillon *et al.*, 1981b) (Figure 100) :

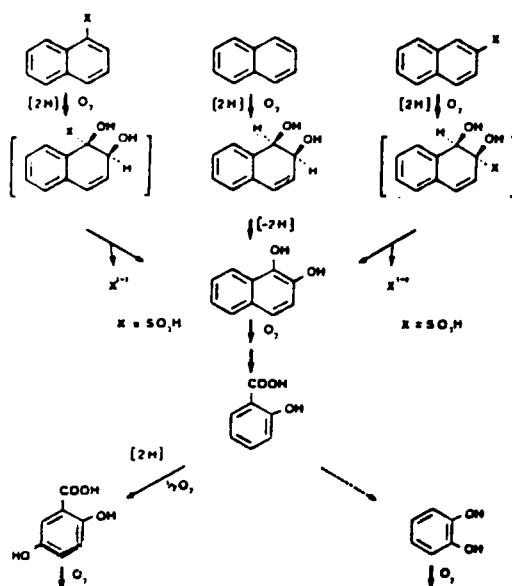


Figure 100 : Mécanisme de dégradation de l'acide 1-naphtalène sulfonate par *Pseudomonas sp.* A3 et de l'acide 2-naphtalène sulfonate par *Pseudomonas sp.* C22.

Comme l'ont observé Cain & Farr (1968), Bird & Cain (1974) et Endo *et al.* (1977), la dihydroxylation des naphtalènes sulfonates s'effectue sur le carbone substitué avec le groupement sulfonate et un des carbones voisins. L'hydroxylation aboutit de la même façon à l'élimination du groupement - SO₃H. La dégradation se poursuit ensuite par l'ouverture successive des deux cycles aromatiques jusqu'à l'assimilation totale (cf. 2.3.3.4.).

Le mécanisme de dégradation d'un acide carbazole sulfonique dépendra donc certainement de la position du substituant dans la molécule, puisque la dihydroxylation semble se faire, la plupart du temps, sur le carbone substitué et sur un de ses plus proches voisins (Figure 101).

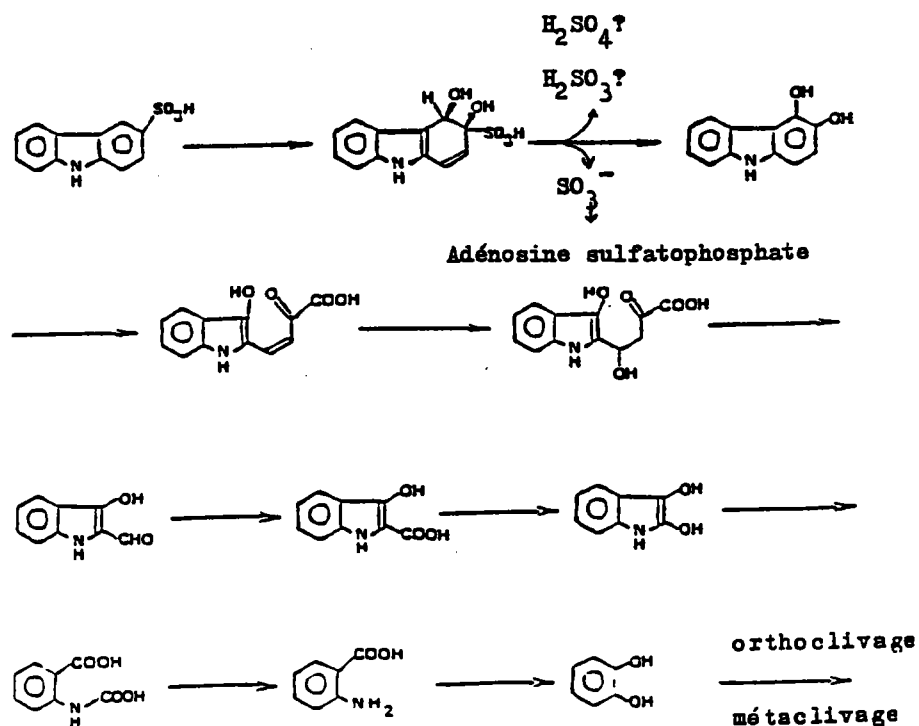


Figure 101 : Mécanisme théorique de dégradation de l'acide 3-carbazole monosulfonique.

Dans le cas de l'acide 3-carbazole sulfonique, le mécanisme théorique de dégradation est identique après élimination du groupement sulfonate à celui présenté dans le chapitre 2.3.4.

Si la monosulfonation du carbazole conduit à la formation de 2-carbazole sulfonate, le mécanisme correspondra probablement à celui de la figure 102 :

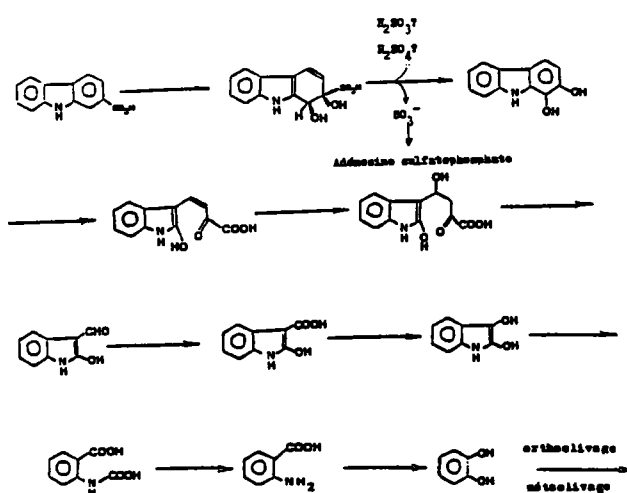
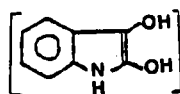


Figure 102 : Mécanisme de dégradation de l'acide 2-carbazole sulfonique.

Le mécanisme de la figure 102 est semblable à celui de la figure 63 et du chapitre 2.3.4., et peut mener similairement à la formation d'isatine



et donc de précurseurs de l'indole.

Dans le cas d'un acide carbazole di, tri ou tétra sulfonique, il est probable que la dégradation débutera par l'élimination d'un des substituants - SO₃H avec hydroxylation en diol et se poursuivra par l'ouverture du cycle au niveau de ce diol. De ce fait, si tel est le cas, il faut s'attendre à obtenir des métabolites sulfonés.

En définitive, il faut donc absolument que le carbazole soit monosulfoné, puisque le groupement - SO₃H oriente la dégradation de l'hydrocarbure (la dégradation débutant par l'élimination de ce groupement et par la dihydroxylation du cycle). Les produits de dégradation du carbazole ne sont alors plus sulfonés et correspondent pour certains à des précurseurs de l'indole.

Il faut donc choisir les conditions optimales pour aboutir à la formation de l'acide carbazole monosulfonique.

La solubilisation du carbazole par traitement chimique permet de ne plus utiliser de tensioactifs de synthèse et de ne plus sélectionner un microorganisme produisant le tensioactif capable de solubiliser le carbazole. Le traitement chimique met donc fin aux problèmes que l'utilisation d'un tensioactif peut poser (cf. 2.7.1. et 2.7.2.).

2.8. TECHNIQUES ANALYTIQUES DE DETECTION DES METABOLITES DE DEGRADATION ET DE SUIVI DE BIODEGRADATION

L'étude de la biodégradation d'une source de carbone ne peut être complète qu'une fois le mécanisme de la biotransformation mis en évidence. Ceci est important car ce type d'études doit permettre de montrer que la molécule étudiée est partiellement ou totalement biodégradable avec les microorganismes testés. Ceci doit permettre de mettre en évidence la présence ou l'absence de métabolites de dégradation toxiques.

Ce chapitre se propose de présenter les différentes techniques utilisées pour analyser :

1. les hydrocarbures utilisés comme source de carbone par les microorganismes et dont la caractéristique majeure est d'être généralement apolaire ou faiblement polaire,
2. les produits de dégradation qui, contrairement aux hydrocarbures, sont généralement polaires.

Le fait que les techniques d'analyses demandent des préparations et des précautions différentes suivant les caractéristiques de polarité ou de non polarité des molécules étudiées implique une présentation séparée des techniques analytiques des hydrocarbures et des produits de dégradation.

Ce chapitre se présente donc en deux parties et insiste sur les différentes techniques de séparations des molécules et d'analyses des molécules purifiées.

2.8.1. TECHNIQUES D'ANALYSES DES HYDROCARBURES

Les hydrocarbures sont généralement constitués d'un mélange de molécules. Il faut donc connaître la composition de ces mélanges afin d'essayer de purifier la molécule qui sera utilisée comme source de carbone.

Pour identifier avec une bonne efficacité, les métabolites de dégradation d'un hydrocarbure, il vaut mieux travailler avec la source de carbone la plus pure possible. D'autre part, suivre la disparition de différents hydrocarbures utilisés comme source de carbone par une bactérie peut permettre d'identifier les structures hydrocarbonées qui sont ou ne sont pas assimilables par le microorganisme, et connaître ainsi les capacités enzymatiques de celui-ci.

C'est pourquoi sont étudiées successivement dans ce chapitre, les techniques de détermination de la composition des hydrocarbures, et les techniques de suivi de leur biodégradation.

2.8.1.1. Détermination de la composition des hydrocarbures

Que cela soit pour étudier un mélange complexe de plusieurs hydrocarbures ou bien pour définir la pureté d'un hydrocarbure, les techniques les plus utilisées sont :

- . la chromatographie sur papier et sur couche mince
- . la chromatographie liquide
- . la chromatographie HPLC
- . la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse.

2.8.1.1.1. La chromatographie sur papier et sur couche mince

Ces deux techniques chromatographiques ne sont plus guère utilisées de nos jours puisqu'elles ne permettent pas, sauf à l'aide de témoins, d'identifier les molécules. Quelques exemples sont présentés dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Exemples de supports et de solvants de migration pour la chromatographie sur papier et sur couche mince (- non rapportée).

Auteurs	Type de chromatographie	Hydrocarbures	Support	Solvants migrateurs	(°C)	T (h)
Matsushita et al., 1963	chromatographie sur papier	polycycliques	gel de silice Woelm	n-hexane O-dichlorobenzène, pyridine (10;1;0,5) 27% humidité relative	29	1
Badger et al., 1963	chromatographie sur papier	polycycliques	cellulose acétylée Whatman	méthanol-éther - eau (4,4,1) toluène-éthanol-eau (4-17-1)	-	-
Randerath, 1971	chromatographie sur couche mince	aromatiques et hétérocycliques	cellulose MN 300 et Alumine G	DMF-EAU (1,1) pour la cellulose pentane-éther (19,1) pour l'alumine	-	-

Ces deux techniques utilisées pour séparer les différents composants d'un mélange sont généralement couplées à la technique de spectrofluorimétrie. Chaque composé est repris séparément par un solvant puis caractérisé et quantifié par spectrofluorescence.

Bender *et al.* (1964) étudient ainsi le carbazole et ses dérivés et Sawicki *et al.* (1964) les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

2.8.1.1.2. La chromatographie liquide

La chromatographie liquide, comme la chromatographie sur papier ou sur couche mince, est utilisée pour séparer différentes fractions de mélanges complexes d'hydrocarbures, mais ne permet pas l'identification des fractions. Cette technique est donc généralement couplée à une technique d'identification (Tableau 5).

Tableau 5 : Techniques de chromatographie liquide couplées à différentes techniques d'analyses.

Auteurs	Mélanges d'hydrocarbures	Support	Solvants de migration	Techniques d'identification
Radke et al., 1984	pétrole	Alumina Woelm B-Super 1 (50 à 200 µm)	n-hexane et dichlorométhane	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
Schmitter & Arpino, 1985	azaarènes	système en phase reverse	méthanol - eau	- spectrométrie de masse - UV - fluorescence
Ciccioli et al., 1986	échantillons atmosphériques (émissions industrielles de PAH)	Alumina Woelm (70 à 150 mesh)	n-hexane dichlorométhane acétonitrile, acétonitrile-méthanol (3-1)	- HPLC - chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

2.8.1.1.3. La chromatographie HPLC

Le système HPLC peut être utilisé pour quantifier les hydrocarbures et les identifier avec l'aide d'étalons (Tableau 6).

Tableau 6 : Analyses d'HAP par HPLC.

Auteurs	Appareil	Support de la colonne	Liquide vecteur	Détecteur	Hydrocarbures
Wijayarathne & Means 1984	Waters M-45 Injecteur Rheodyne 7125	C-18 Seppak cartridge (Waters)	Acétonitrile - K_2HPO_4 0,05M pH = 5,10	- UV (254 nm) Waters 440 - spectrofluorimètre Perkin-Elmer 650-10S	Hydrocarbures Aromatiques polycycliques d'une eau d'estuaire
Dennis et al., 1984	Injecteur Rheodyne à volume fixe Waters	précolonne spherisorb ODS 5 µm + colonne Vydac ODS 5 µm	gradient linéaire Acétonitrile - eau	- Perkin-Elmer 3000 spectro fluorimètre - Perkin-Elmer 1000 M spectro fluorimètre	Hydrocarbures Aromatiques polycycliques dans de la viande de porc grillée

La chromatographie HPLC peut donner, d'un point de vue quantitatif, d'aussi bons résultats que la chromatographie en phase gazeuse (Dennis *et al.*, 1984) mais, lors de l'étude de mélanges très complexes (pétrole, essence, huiles...), la chromatographie HPLC est plutôt utilisée comme technique de fractionnement, chaque fraction étant ensuite analysée par chromatographie en phase gazeuse et par spectrométrie de masse (Lichtenthater & Orelid, 1983 ; Stray *et al.*, 1984 ; Tong & Karasek, 1984).

2.8.1.1.4. La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse est la technique la plus utilisée pour la séparation et la quantification des hydrocarbures, et ceci pour deux raisons :

- . les phases des colonnes chromatographiques présentent une excellente affinité avec les composés apolaires comme les hydrocarbures,
- . l'identification des molécules par couplage avec un spectromètre de masse est une technique tout à fait au point et qui donne d'excellents résultats.

Le tableau ci-après présente une liste non exhaustive des auteurs utilisant cette technique chromatographique pour doser les hydrocarbures (Tableau 7).

2.8.1.2. Techniques de suivi de la biodégradation des hydrocarbures

La spectrophotométrie UV et la chromatographie en phase gazeuse sont les deux techniques qui permettent de suivre la biodégradation des hydrocarbures. Ces techniques d'analyse peuvent permettre de définir la cinétique de disparition d'une source de carbone, la cinétique d'apparition de métabolites, ou bien de définir les hydrocarbures d'un mélange complexe qui sont utilisés comme source de carbone par le microorganisme étudié.

1.8.1.2.1. La chromatographie en phase gazeuse

Si de nombreuses bactéries sont capables de croître dans des mélanges très complexes d'hydrocarbures, comme le pétrole brut, il n'est pas facile de connaître leur spécificité et de définir quelle fraction (aromatique, saturée...) les microorganismes étudiés sont capables d'utiliser comme source de carbone.

La chromatographie en phase gazeuse permet de répondre à cette question.

L'utilisation de pétrole brut par *Micrococcus sp.* (Jobson *et al.*, 1972) (Figure 103) et par des populations mixtes (Jobson *et al.*, 1972 ; Walker *et al.*, 1975 ; Donaldson, 1984) a été étudiée en fonction de l'âge des cultures par chromatographie en phase gazeuse.

De la même façon, la dégradation de l'heptadécane et de l'hexadécane par quatre souches de *Mycobacterium fortuitum* et une souche de *Mycobacterium triviale* a été quantifiée.

Tableau 7 : Appareillage d'analyses des hydrocarbures aromatiques polycycliques par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Auteurs	Colonne	Gaz vecteur	Injecteur	Program- mation en ° (°C)	Détecteur	Hydrocarbures
Derenbach 1985	CPG Fracto vap 2900 colonne capillaire à 0,4% SE52 (25 m de long 0,3 mm ø interne)	He 1,5 à 2 ml/mn	Splitl ess 30 secondes à 40°C	isotherme à 40°C pdt 2 mn 40-50°C 10°C/mn 50-220°C 4°C/mn	spectromètre de masse 5992 A (Hewlett- Packard)	hydrocarbures volatiles d'échantillons d'eaux de sur- face de la mer Baltique
Matsumoto & Kashimoto 1985	HP 5710A colonne capillaire SE 54 (25 m de long 0,31 mmø interne)	He 1ml/mn	Splitl ess	isotherme à 150°C pdt 2 mn 150°C - 300°C à 4°C/mn isotherme à 300°C pdt 8 mn	spectromètre de masse JOEL JMA DX - 300	HAP d'échan- tillons d'air ambiant
Low et al. 1986	colonne de silice BP-1 (25 m de long 0,32 mm ø interne)	He 1ml/mn	Splitl ess	isotherme à 100°C pdt 2 mn 100°C - 300°C à 6°C/mn	Finnigan Quadrupole Modèle 3200 Chromato- graphie en phase gazeuse couplée à spectromètre de masse	HAP d'échan- tillons de poussière de charbon
Sporstøl et al. 1983	colonne capillaire silice DB5 (30 m de long 0,256mmø interne)	He 40cm/sec à 60°C	Splitl ess	isotherme 60°C pdt 1 mn 60°C - 300°C à 4°C/mn 300°C pdt 15 mn	Finnigan 4021 Quadrupole spectromètre de masse	HAP d'échan- tillons de sédiment

La chromatographie permet de montrer que *Micrococcus sp.* utilise la fraction saturée du pétrole brut et que la dégradation est pratiquement achevée au bout de sept jours.

2.8.1.2.2. La spectrophotométrie

Si cette technique est plus pratique que la chromatographie en phase gazeuse, elle est aussi d'une utilisation plus restreinte :

- . il faut évidemment que la source de carbone adsorbe en UV
- . il est impossible de suivre, dans la même expérience, le métabolisme complet de dégradation d'une source de carbone complexe. En effet, la production dans le milieu de culture de plusieurs métabolites, dont les spectres d'absorption peuvent se superposer, ne permet pas l'identification des métabolites et l'établissement de leur cinétique d'apparition ou de disparition.

La spectrophotométrie UV est utilisée pour mettre en évidence des activités enzymatiques et établir des séquences de dégradation (Kiyohara & Nagao, 1977) (Figure 104).

Le suivi en UV de la dégradation du 1-hydroxy 2-naphtoate par l'extrait enzymatique de la bactérie *Aeromonas sp.* a permis de reconstituer une séquence de la dégradation du phénanthrène par cette bactérie (Figure 110).

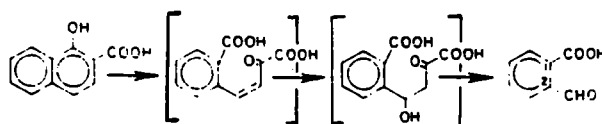


Figure 105 : Séquence de dégradation du phénanthrène par *Aeromonas sp.*, reconstituée par un suivi en spectrophotométrie UV. Les produits entre parenthèses n'ont pas été identifiés.

2.8.2. TECHNIQUES D'ANALYSES DES METABOLITES

Les métabolites de dégradation des hydrocarbures conservent une structure hydrocarbonée spécifique aux hydrocarbures malgré les réactions enzymatiques qu'ils subissent. De ce fait, les techniques d'analyses des hydrocarbures sont aussi applicables à leurs métabolites et correspondent comme précédemment à :

- . la chromatographie sur papier et sur couche mince
- . la chromatographie liquide
- . la chromatographie HPLC
- . la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse.

Cependant, leur polarité nécessite de prendre des précautions que ne demandait pas l'analyse des hydrocarbures et de modifier les protocoles de préparation des échantillons à analyser.

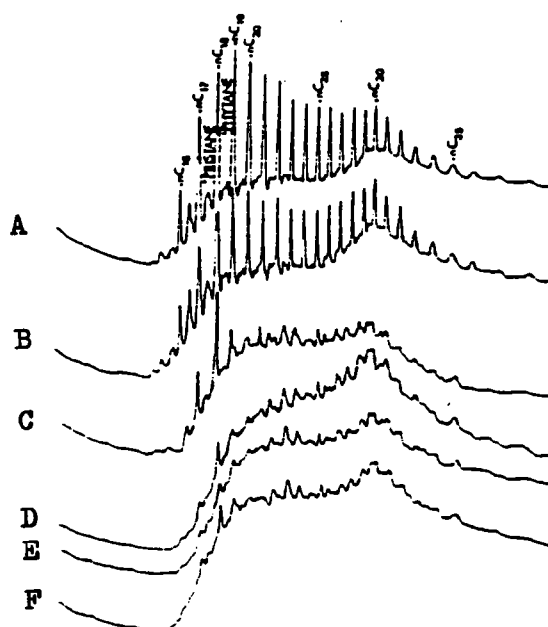


Figure 103 : Evolution de la fraction saturée du pétrole brut comme source de carbone de *Micrococcus sp.* à 30°C.
 A : Initiale ; B : après 2 jours d'incubation ; C : après 5 jours d'incubation ; D : après 7 jours d'incubation ; E : après 14 jours d'incubation ; F : après 21 jours d'incubation.

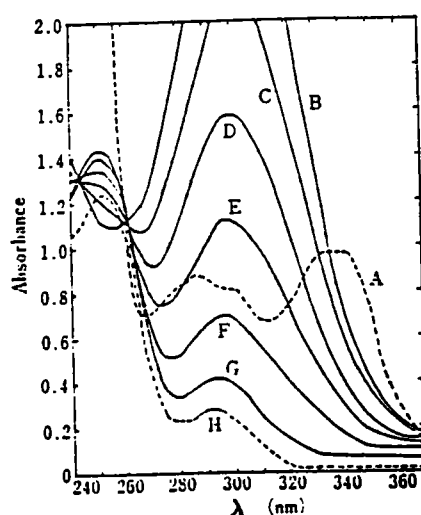


Figure 104 : Changement de spectre durant la dégradation du 1-hydroxy 2-naphtoate par un extrait enzymatique de la bactérie *Aeromonas sp.* S4591 (Kiyohara & Nagao, 1977).
 A : spectre du 1-hydroxy 2-naphtoate ; H : spectre du 2-carboxy benzal-déhyde ; B-C-D-E-F-G : spectres correspondant aux produits de dégradation du 1-hydroxy 2-naphtoate après les incubations de 0,2-3-5-8-11-30 mn dans un extrait enzymatique de la bactérie *Aeromonas sp.*

2.8.2.1. La chromatographie sur papier et sur couche mince

Comme pour les hydrocarbures, ces deux techniques chromatographiques ne sont plus guère utilisées de nos jours puisqu'elles ne permettent pas, sauf avec l'aide d'étalons, d'identifier les molécules.

Quelques exemples sont présentés dans le tableau 8.

Ces deux techniques, utilisées pour séparer les différents composants d'un mélange, sont généralement couplées à d'autres techniques d'analyses spécifiques aux corps purs.

Par contre, les chromatographies sur papier et sur couche mince permettent de caractériser les différentes fonctions qui constituent les molécules étudiées (Tableau 9).

2.8.2.2. La chromatographie HPLC

La chromatographie HPLC peut être utilisée pour quantifier la production de métabolites de dégradation d'hydrocarbures (Cerniglia, 1984a) à la condition *sine qua non* de posséder les étalons dans un but d'identification (Maloney *et al.*, 1986).

La chromatographie HPLC permet de séparer, dans un but de purification, les métabolites de l'hydrocarbure qui sert de source de carbone pour les microorganismes (Cerniglia & Yang, 1984) ou bien les métabolites entre eux, afin de les analyser (cf. 2.8.3.) (Wu & Wong, 1981 ; Latorre *et al.*, 1984 ; Nesnow *et al.*, 1984 ; Cerniglia *et al.*, 1984b ; Zeyer *et al.*, 1985).

La chromatographie HPLC permet aussi de suivre des réactions enzymatiques d'apparition ou de disparition de métabolites (Durham , 1984).

Le tableau 10, ci-après, donne quelques exemples de métabolites étudiés par HPLC.

Le liquide vecteur est souvent constitué d'un mélange eau-méthanol avec un gradient de concentration, afin de travailler en fonction des variations de solubilité et d'obtenir une meilleure séparation. Le détecteur UV est réglé à 254 nm afin de repérer les métabolites aromatiques, et les colonnes universelles C₁₈ sont les plus utilisées.

Dans l'étude des métabolites de biodégradation, la technique HPLC est préférable à la chromatographie liquide car celle-ci permet une meilleure séparation des très nombreux composés qui peuvent être rencontrés dans des milieux de cultures (source de carbone, métabolites, tensio-actifs, molécules dues à la lyse cellulaire).

2.8.2.3. La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse, comme la chromatographie HPLC, peut être utilisée pour quantifier la production des métabolites de dégradation d'hydrocarbures à la condition *sine qua non* de posséder les étalons dans un but d'identification.

Tableau 8 : Exemples de supports et de solvants de migration pour la chromatographie sur papier et sur couche mince pour l'étude de la dégradation de certains hydrocarbures.

Auteurs	Type de chromatographie	Métabolisme étudié	Support	Solvants migrateurs
Evans et al., 1965	sur papier	phénanthrène	Whatman N°54	formate de sodium (5%) -acide formique (200/1) 1-butanol-eau-ammoniaque (20/2/1) éthanol-ammoniaque-eau (16/1/3) benzène-acide acétique-eau (125/72/3)
Nakajima et al., 1974, 1985a et 1985b	sur couche mince	Isoprenoïdes	gel de silice nitrate d'argent	benzène-acétone (20/1)
Tadasa & Kayahara, 1983	sur couche mince silice BP-1 (25 m de long 0,32 mm ø interne)	Eugenol	?	benzène-dioxane-acide acétique (90/25/4) benzène-méthyléthyl-cétone-acide formique (80/18/2)
Davies & Evans, 1964	sur papier	naphtalène	Whatman N°54	éthanol-ammoniaque-eau (16/1/3) formate de sodium-acide formique (200/1) 2-propanol-eau-ammoniaque (20/2/1) 1-butanol-éthanol-ammoniaque (0.5N) (7/1/2) 1-butanol-éthanol-eau (7/1/2)
Kiyohara et al., 1976	sur couche mince	phénanthrène	Kieselgel G	éther de pétrole-benzène-acétone-acide acétique (80/20/10/4)

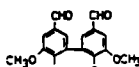
Tableau 9 : Mise en évidence de différentes fonctions par vaporisation de réactifs spécifiques après migration des différents composés d'un mélange par chromatographie sur papier ou sur couche mince.

Auteurs	Fonctions	Révélation	Couleurs des Spots
Davies & Evans, 1964 Kiyohara <i>et al.</i> , 1976 Evans <i>et al.</i> , 1965	phénol	réactif de Folin-Ciocalteu exposé aux vapeurs d'ammoniaque et à chaud	bleu
	acide carboxylique	réactif vert de bromocrésol 0,05% dans 90% d'éthanol	jaune
	fonctions carbonyles	réactif 0,5% de 2,4-dinitrophénylhydrazine dans méthanol avec chauffage	jaune à orange
	aldéhyde	réactif O-dianisidine-acide acétique saturé avec chauffage	brun
	α -Oxo-acide carboxylique	O-phénylènediamine dans acide trichloroacétique	vert-jaunâtre (sous UV)

Tableau 10 : Utilisation de la technique HPLC pour étudier et séparer les métabolites de dégradation.

Auteurs	Support de la colonne	Détecteur	Liquide vecteur	Molécules étudiées
Wu & Wong, 1981	colonne octa-décylsilane (Altex-Berkeley)	UV (254 nm)	gradient eau-méthanol (25-100% CH ₃ OH) D = 1 ml/mn	7-hydroxyméthyl 12-méthyl benzan-thracène & 12-hydroxyméthyl 7-méthyl benzan-thracène
Cerniglia & Yang, 1984	5-μ C ₁₈ ultrasphere ODS column (4,6 x 25 mm) (Altex Scientific, Berkeley)	UV (254 nm)	gradient eau-méthanol (1:1) à (19:1) D = 1 ml/mn	séparation des métabolites de l'anthracène et du phénanthrène des deux sources de carbone
Zeyer <i>et al.</i> , 1985	Radial PAKC ₁₈ ø 8 mm taille particule 5 μm (Waters Associates)	UV (254 nm)	eau-méthanol (30:70) D = 2,5 ml/mn	séparation des métabolites des sources de carbone constituées de composés substitués de l'aniline
Nesnow <i>et al.</i> , 1984	Zorbax-ODS		eau-méthanol ou eau-méthanol tétrahydrofurane (gradient)	séparation des métabolites d'hydrocarbures aromatiques polycycliques
Anderson & Purdy, 1979	μ-Bondapak C ₁₈ de 10 μm ø particules (Waters Associates)	fluorimètre avec lampe de mercure excitation à 254 nm)	CH ₃ COONa 0,01M -CH ₃ CN (9:1) (7:3) CH ₃ COONa 0,01M -CH ₃ OH (97:3)	détermination de structures indoliques
Banwart <i>et al.</i> , 1985	colonne de 25 cm Beckman C ₁₈ Ultrasphere ODS	2 détecteurs UV en série (254 nm et 280 nm)	mélange complexe eau, acide acétique glacial, méthanol, n-butanol, acétate d'ammonium (gradient)	séparation de · acides benzoïques · benzaldéhydes · phénols · acides acétiques · acides cinnamiques · coumarines · flavanones et flavones · indole

Tableau 11 : Utilisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse dans l'étude des métabolismes de biodégradation.

Auteurs	Colonne	Conditions chromatographiques	Détecteur	Molécules étudiées
Blasig <i>et al.</i> , 1984	15% DEGS ou 3% Dexsil 300 dans Chromosorb W AW DMCS (80-100 mesh)	Gaz vecteur N ₂ D = 3 l/h	F.I.D. ou Spectromètre de masse MS 902 S (AEI)	métabolites de dégradation des n-alcanes C ₄ - C ₁₆ - C ₁₇
Chen <i>et al.</i> , 1985	colonne de verre (1 m x 2 mm ø) remplie de phase type OV1	Gaz vecteur N ₂ Température de la colonne 170°C en isotherme	Spectromètre de masse JEOL TMS - D100	métabolisme de dégradation de la Déhydrodivanilline 
Rontani <i>et al.</i> , 1985	colonne de verre remplie avec la phase OV1 (50 m x 0.3 mm)	Helium-gaz vecteur (0.9 bar) θ° détecteur : 290°C θ° injecteur : 300°C θ° four : 110°C à 290°C (3°C/mn)	F.I.D. ou spectromètre de masse RIBERMAG R-10-10-C	métabolisme de dégradation de l'anthracène
Rontani <i>et al.</i> , 1985a	colonne de 50 mx 0.3 mm ø	gaz vecteur He θ° détecteur : 290°C θ° injecteur : 300°C θ° four : 110°C à 290°C (3°C/mn)	F.I.D. ou spectromètre de masse RIBERMAG R-10-10-C	métabolisme de dégradation des Alkylbenzènes substitués
Nakajima <i>et al.</i> , 1985	colonne de verre remplie	gaz vecteur He (0.5 kg/cm ²) θ° four : 120 à 200°C	spectromètre de masse JEOL Model JMS (CPG - SM)	métabolisme d'oxydation du phytane, norpris-tane et farne-sane (alcane - isoprène)

La chromatographie en phase gazeuse, si elle permet la séparation des différents composés d'un mélange (Korhonen, 1986a, 1986b), ne permet pas, à l'instar de la chromatographie HPLC, la récupération des composés en vue de leur purification.

Par contre, le couplage avec la spectrométrie de masse permettant l'identification des produits de dégradation est une technique largement utilisée et beaucoup plus pratique qu'avec une chromatographie HPLC (Tableau 12).

La chromatographie en phase gazeuse est une technique très fine qui permet de mesurer des quantités de l'ordre du picogramme, avec un détecteur à capture d'électrons, de composés aminés et hydroxylés (Ehrsson *et al.*, 1971 ; Walle & Ehrsson, 1970).

Son couplage à la spectrométrie de masse fait que cette technique s'impose souvent lors de l'identification ou la détection de produits en très faibles quantités (quelques nanogrammes) présents dans des mélanges complexes (David *et al.*, 1986).

Le spectre de masse de la molécule, obtenu par bombardement électronique, est caractéristique de la molécule, l'identification de l'ion moléculaire étant obtenue par ionisation chimique en présence d'ammoniaque (David *et al.*, 1986), de méthanol ou de vapeur d'eau (Hawthorne & Miller, 1986).

Cependant, la chromatographie en phase gazeuse nécessite de prendre certaines précautions. En effet, les composés carboxyles, hydroxyles et aminés ont généralement peu d'affinité avec les colonnes chromatographiques usuelles (OV - 1, SE - 30, ...). Ces composés seront, soit fixés sur la colonne qui sera alors détériorée et perdra de son efficacité, soit difficiles à quantifier du fait de leur mauvaise résolution chromatographique (les pics étant alors très étalés).

D'autres composés peuvent être détruits dans l'injecteur qui est toujours à haute température (250 à 300°C). Il est alors souvent nécessaire, en chromatographie en phase gazeuse, de protéger les molécules étudiées en les dérivant.

Les techniques de dérivation sont très nombreuses et nécessitent l'utilisation d'un catalyseur avec l'agent dérivant. Les plus utilisées sont les techniques d'acylation et d'acétylation (Walle & Ehrsson, 1970 ; Kawahara *et al.*, 1982), de méthylation (Ogawa *et al.*, 1986 ; Herrmann *et al.*, 1986 ; Nichols *et al.*, 1986) et de silylation (Brooks *et al.*, 1984 ; Colberg & Young, 1985 ; Massé *et al.*, 1985 ; Tulloch, 1985 ; Masunaga *et al.*, 1986 ; Tsaconas *et al.*, 1986).

2.8.3. TECHNIQUES D'ANALYSES DES PRODUITS DE DEGRADATION PURIFIES

Après avoir optimisé les techniques de séparation par chromatographie sur papier, sur couche mince, liquide et HPLC, il est nécessaire pour identifier les molécules purifiées de mettre en oeuvre différentes techniques d'analyses :

. Spectrophotométrie dans l'ultraviolet

La spectrométrie dans l'ultraviolet permet de caractériser les molécules étudiées (présence ou absence de cycle aromatique...) par comparaison avec une banque de données ou avec des étalons (Nesnow *et al.*, 1984 ; Cerniglia *et al.*, 1984, 1984b, 1984c ; Durham & Perry, 1978 ; Cook *et al.*, 1983).

Cette technique permet aussi de quantifier en comparant avec un étalon la production de métabolites (Szewzyk *et al.*, 1985).

Quant à l'ouverture du cycle aromatique de certains composés comme le 2,3-dihydroxy-paratoluate, elle peut être mise en évidence en ultraviolet par ajout de cation ammonium (Ribbons & Senior, 1970) (Figure 106).

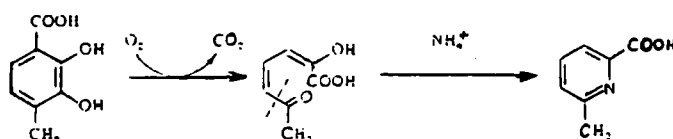


Figure 106 : Caractérisation de l'ouverture du cycle aromatique du 2,3-dihydroxytoluate par réaction avec le cation ammonium pour former le 6-méthylpicolinate.

Le 6-méthylpicolinate peut alors être identifié en UV car il possède un maximum d'absorption à 272 nm. Ce pic d'absorption permet de montrer une séquence de la biodégradation du 2,3-dihydroxytoluate.

. Spectrophotométrie dans l'infrarouge

La spectrophotométrie dans l'infrarouge permet de caractériser les molécules étudiées, de définir le type de chaîne hydrocarbonée (aromatique ou non) et le type de substituant (Davies & Evans, 1964 ; Yamada *et al.*, 1985 ; Nakajima *et al.*, 1985a et 1985b). La spectrophotométrie dans l'infrarouge permet aussi d'identifier certaines molécules par comparaison avec leur étalon (Nakajima *et al.*, 1974 ; Kiyohara *et al.*, 1976 ; Izumori *et al.*, 1984).

. Résonance magnétique nucléaire

La technique de la résonance magnétique nucléaire du Proton est la plus utilisée pour caractériser les molécules étudiées et définir les substituants et leur position (Nakajima *et al.*, 1974 ; Ribbons & Eaton, 1982 ; Tadasa & Kayahara, 1983 ; Umezawa *et al.*, 1983 ; Auret *et al.*, 1984 ; Sugai & Mori, 1984 ; Nakajima *et al.*, 1985 ; Sariaslani & Rosazza, 1985). C'est d'ailleurs par cette technique que peuvent être différenciés les *cis*-dihydroxy dihydriols des

transdihydroxy dihydrodiols (Jerina *et al.*, 1974 ; Akhtar *et al.*, 1975 ; Gibson *et al.*, 1975 ; Nesnow *et al.*, 1984).

La RMN- ^1H n'est pas la seule technique utilisée. En effet, la RMN de l'isotope de l'azote ^{15}N peut être utilisée pour suivre et valider un mécanisme d'assimilation de l'azote par les bactéries (Baxter, 1985a) et la RMN de l'isotope du phosphore ^{31}P pour étudier l'ATP, les sucres monophosphatés ou encore le phospho-3-glycérate (Baxter, 1985a). La RMN de l'isotope du carbone ^{13}C peut être utilisée pour mettre en évidence certaines voies métaboliques chez les bactéries.

C'est ainsi qu'il a été montré que l'oxytétracycline était un produit d'une réaction enzymatique de polymérisation de l'acide malonique (Baxter, 1985b).

Spectrométrie de masse

La molécule purifiée peut être analysée par spectrométrie de masse. Il s'agit d'une introduction directe dans le spectromètre qui évite ainsi de dériver la molécule pour assurer son passage dans le chromatographe en phase gazeuse. Cette technique peut permettre d'établir la structure de la molécule, mais aussi de définir son poids moléculaire (Cerniglia *et al.*, 1984a ; Cerniglia *et al.*, 1984b ; Cerniglia *et al.*, 1984c ; Gibson *et al.*, 1975 ; Sariaslani & Rosazza, 1985 ; Maloney *et al.*, 1986).

2.8.4. TECHNIQUES D'ANALYSES ENZYMATIQUES

Dans le cas où une bactérie est capable de dégrader totalement un substrat carboné, l'analyse enzymatique correspond à la technique qui permet de reconstituer de façon complète un mécanisme de biodégradation. En effet, cette technique ne tient pas compte de la production des métabolites qui ont une durée de vie plus ou moins longue, mais considère la richesse enzymatique de la cellule.

La technique consiste à mettre en évidence les différentes activités enzymatiques mises en jeu lors de la biodégradation d'une source de carbone dans un extrait obtenu après broyage des cellules du microorganisme choisi et adapté à cette source de carbone puis élimination des débris par centrifugation (Evans *et al.*, 1965 ; Davies & Evans, 1964 ; Feist & Hegeman, 1969).

Après avoir établi le mécanisme le plus probable de la biodégradation de la source de carbone, il faut acquérir ou synthétiser les différentes molécules correspondant aux différentes étapes du schéma théorique de biodégradation (Ribbons & Senior, 1970 ; Bayly & Wigmore, 1973 ; Eaton & Ribbons, 1982).

Il "suffit" ensuite de suivre la disparition des différentes molécules en les ajoutant à l'extrait enzymatique obtenu précédemment.

Toutes les techniques analytiques présentées dans les précédents chapitres peuvent être alors utilisées pour suivre les cinétiques de disparition ; cependant la spectrophotométrie dans l'ultraviolet reste la plus usitée (Latorre *et al.*, 1984 ; Durham *et al.*, 1984).

Si l'une des molécules ne subit pas de transformation enzymatique, cela signifie que le mécanisme théorique proposé est faux ; il faut alors essayer d'en prévoir un deuxième puis peut-être un troisième jusqu'à ce que toutes les molécules du mécanisme théorique de biodégradation soient enzymatiquement transformées.

Ensuite, pour confirmer les étapes du mécanisme de biodégradation qui a été retenu, il est nécessaire de comparer les résultats (cinétiques, produits formés...) obtenus avec l'extrait enzymatique, en effectuant des réactions étalons entre les molécules considérées comme étant les produits de la biodégradation étudiée et les enzymes obtenues commercialement dont les propriétés correspondent aux mécanismes de transformations attendus (Hammond *et al.*, 1986 ; Wofford *et al.*, 1986).

Il s'agit actuellement de la seule technique permettant d'établir avec certitude un mécanisme de biodégradation. Cependant, les analyses enzymatiques peuvent être très longues à être mises en oeuvre et très coûteuses (importantes recherches bibliographiques, nombreuses synthèses organiques, achat d'enzymes...).

C'est pourquoi, actuellement, les analyses se portent sur les produits de dégradation extracellulaires qui peuvent être identifiés à l'aide des méthodes analytiques présentées dans les chapitres précédents après élimination des bactéries par centrifugation et extraction des produits de dégradation avec un solvant organique (généralement l'acétate d'éthyle) (Massé *et al.*, 1985 ; Masunaga *et al.*, 1986).

Cependant, ces analyses ne permettent généralement pas de reconstituer un mécanisme complet de biodégradation, puisque peu de produits de dégradation sont extracellulaires.

Seule l'analyse enzymatique permet de construire le schéma complet d'un métabolisme.

3. MATERIELS et METHODES

3.1. POPULATIONS BACTERIENNES

3.1.1. POPULATIONS AUTOCHTONES

Deux sites d'échantillonnage ont été retenus pour sélectionner des microorganismes autochtones capables d'utiliser comme source de carbone le carbazole et l'acide carbazole sulfonique :

- . la station d'épuration de METZ
- . le site industriel de MARIENAU.

* Trois échantillons de boues activées ont été prélevés à la station d'épuration de METZ, le 24.11.1984, le 5.12.1984 et le 7.09.1985 codés respectivement BA1, BA2 et BA3.

Pour chaque échantillon, 100 ml de boues activées ont été agités au vortex pour dissocier les floccs bactériens puis filtrés sous vide au travers d'un filtre de 5 μ m (millipore SMWP 04700) afin de récupérer uniquement les bactéries libres.

L'échantillon filtré de 100 ml est ensuite centrifugé à 1000 g pendant 15 minutes pour concentrer les bactéries. Le surnageant est rejeté et le culot cellulaire est remis en suspension avec 30 ml d'eau distillée stérile. La suspension lavée, ainsi obtenue, est utilisée au cours des essais. Ces opérations sont absolument nécessaires pour pouvoir effectuer des tests sur le carbazole seul. Il faut donc préparer des extraits bactériens débarrassés de tout autre substrat carboné.

* Trois échantillons respectivement codés M1, M2 et M3 ont été prélevés sur le site industriel de traitement des goudrons de MARIENAU (Moselle).

Les échantillons ont été prélevés à même le sol et placés dans des récipients stériles près des chaînes de traitement des différentes phases d'hydrocarbures :

- . un échantillon sur le site de préparation des huiles anthracéniques (M1)
- . un échantillon sur le site de préparation des huiles chrysènes (M2)
- . un échantillon sur le site de préparation des brais (M3).

Toute bactérie adaptée à des structures aromatiques complexes peut être utilisée dans l'étude de la biodégradation du carbazole.

Au laboratoire, après une mise en suspension des échantillons dans 100 ml d'eau distillée stérile, ceux-ci sont traités de la même façon que ceux de la station d'épuration de METZ.

3.1.2. SOUCHES PURES

La souche pure *Proteus vulgaris* provenant de l'Institut Pasteur a été choisie dans cette étude pour sa capacité à produire de l'indole lors de la dégradation du tryptophane (Boulanger *et al.*, 1973). De plus, deux souches bactériennes *Agrobacterium* et *Corynebacterium* isolées de l'échan-

tillon BA1, et une souche *Pseudomonas* isolée de l'échantillon BA3, ont aussi été utilisées en culture pure.

3.2. LE CARBAZOLE

Le carbazole utilisé est commercialisé par Merck (Article 820255). Son point de fusion est compris entre 241 et 244°C et sa pureté est de 98%.

L'identification des molécules correspondant aux 2% d'impuretés a été accomplie par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse.

Cette étude a été menée dans le service de spectrométrie de masse de l'Université de NANCY 30, rue Lionnois 54000 NANCY, avec un spectromètre de masse RIBERMAG R - 10 - 10C.

Les caractéristiques de la colonne capillaire SE - 30 du chromatographe en phase gazeuse sont les suivantes :

- . longueur = 25 m
- . diamètre interne = 0,22 mm
- . épaisseur de la phase = 0,20 μm .

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- . injecteur spitless = 250°C
- . spectromètre de masse réglé en impact électronique = 70 eV
- . four : température initiale 100°C pendant 1 minute
température finale 250°C
gradient de montée en température 10°C/minute.

Le chromatogramme obtenu est présenté sur la figure 107.

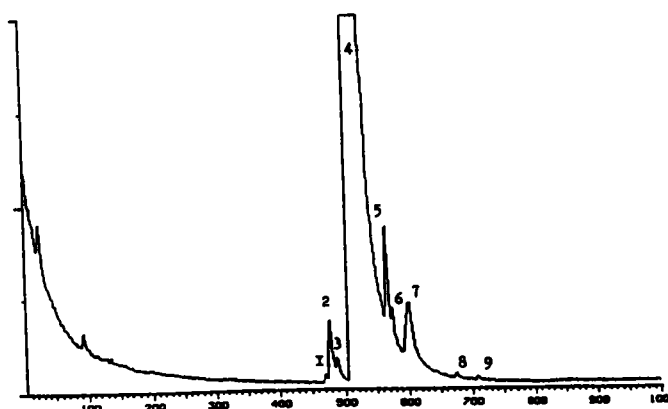


Figure 107 : Chromatogramme de l'étalon carbazole (Merck 820255) dissous dans de la pyridine (Prolabo 27.199.292).

Le chromatogramme du carbazole (Merck 820255) a permis d'identifier huit impuretés dans le carbazole (Figure 107) :

- . Pic 1 = Anthracène
- . Pic 2 = Phénanthrène
- . Pic 3 = Acridine ou 5,6-benzoquinoline ou 7,8-benzoquinoline ou phénanthridine
- . Pic 4 = Carbazole
- . Pics 5 et 6 = Méthyl-phénanthrène ou/et Méthyl-anthracène
- . Pic 7 = Méthylcarbazole
- . Pic 8 = Fluoranthène
- . Pic 9 = Pyrène.

Les spectres de masse des huit impuretés sont rassemblés dans l'annexe 1.

3.3. L'ACIDE CARBAZOLE MONOSULFONIQUE

L'acide carbazole monosulfonique utilisé comme source de carbone par les bactéries est synthétisé à l'aide du protocole suivant :

10 grammes de carbazole (Merck 820255) sont mis en suspension dans 150 ml de nitrobenzène (Merck 806770). La température du milieu est fixée entre 15 et 17°C avec un bain réfrigérant. 4 millilitres d'acide chlorosulfonique (Prolabo 22697290) sont versés doucement dans le mélange. Le temps de réaction est de trois heures.

L'excès d'acide chlorosulfonique est neutralisé avec NaHCO_3 (Prolabo 2777829). Cette neutralisation aboutit à la production de NaCl , Na_2SO_3 , H_2O et CO_2 .

Après avoir filtré (Millipore AP2004700) la phase organique pour éliminer l'excès de NaHCO_3 insoluble et le carbazole n'ayant pas réagi, le nitrobenzène est entraîné à la vapeur d'eau tandis que l'acide carbazole sulfonique se dissout dans l'eau.

La phase aqueuse obtenue est concentrée au rotavapor (60°C) puis lyophilisée pendant 48 heures (HETOSIC CD 52).

Deux techniques analytiques ont été utilisées pour l'identification du produit de synthèse :

1. L'ultra-violet : le spectre obtenu (Figure 108) a été accompli sur l'appareil KONTRON UVIKON 810 entre 200 et 400 nm (Cuve QS 4281/2x HELLMMA) à la concentration de 2 mg/l dans de l'eau distillée.

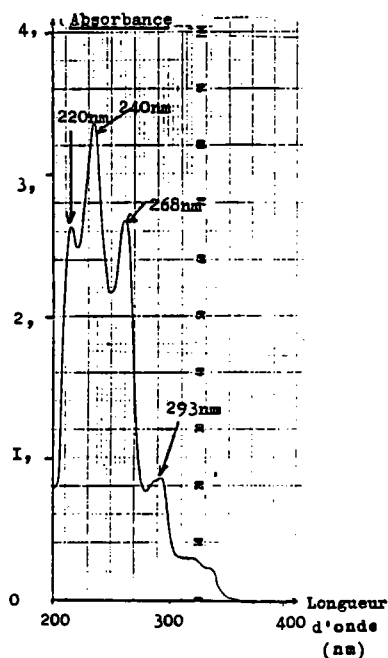


Figure 108 : Spectre UV du produit de sulfonation à la concentration de 2 mg/l dans de l'eau distillée.

Le spectre U.V. du produit de synthèse possède des pics d'absorption similaires au spectre du carbazole (220, 240, 262, 268 et 293 nm).

Le spectre U.V. du carbazole est semblable à celui du produit de sulfonation.

La structure aromatique du carbazole conserve donc son intégrité après la réaction de sulfonation.

2. L'analyse élémentaire C %, N %, H % : l'étude centésimale a été menée sur l'appareil CARLO ERBA STRUMENTAZIONE, de la forme acide ou sel de sodium du produit de sulfonation.

Forme acide



Valeurs théoriques du carbazole	Valeurs théoriques de l'acide carbazole mono-sulfonique	Valeurs théoriques de l'acide carbazole disulfonique	<u>Valeurs observées</u>
% C = 86,23	% C = 58,3	% C = 44,0	% C = 56,03-57,24
% N = 8,38	% N = 5,6	% N = 4,28	% N = 5,06-4,49
% H = 5,39	% H = 3,64	% H = 2,75	% H = 3,85-3,99

Forme saline

Valeurs théoriques du carbazole	Valeurs théoriques du sel de sodium de l'acide carbazole monosulfonique	Valeurs théoriques du sel de sodium de l'acide carbazole disulfonique	<u>Valeurs observées</u>
% C = 86,23	% C = 53,53	% C = 38,8	% C = 54,27-53,10
% N = 8,38	% N = 5,20	% N = 3,77	% N = 5,17-5,14
% H = 5,39	% H = 2,97	% H = 2,42	% H = 3,17-3,09

Le point de fusion de la forme acide n'a pas été déterminé car la molécule hydrophyle devient pâteuse à 100-120°C. Mais en ce qui concerne la forme saline, le point de fusion atteint 280-300°C.

L'analyse centésimale de la forme acide ou sel de sodium montre que le produit de synthèse correspond à l'acide carbazole monosulfonique, les valeurs observées étant assez proches des valeurs théoriques (les variations entre les valeurs obtenues et les valeurs théoriques donnent une idée de la pureté du produit).

Le rendement et la répétabilité de la réaction ont été établis après avoir accompli douze réactions de sulfonation dans les mêmes conditions.

Le rendement est établi en calculant le rapport molaire :

$$R_1 = \frac{\text{Nb de moles d'acide carbazole monosulfonique}}{\text{Nb de moles de carbazole}}$$

Le calcul de rendement est donc établi en supposant que le carbazole et le produit de synthèse sont purs. Le rendement moyen R_1 de synthèse est de :

$$R_1 = 68 \pm 9\%.$$

Cette réaction de sulfonation du carbazole s'accomplit avec un rendement acceptable et permet d'obtenir l'acide carbazole monosulfonique. Aussi, le produit ainsi synthétisé est utilisé comme source de carbone dans l'étude de la dégradation du carbazole par les bactéries.

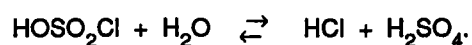
3.4. LES ACIDES CARBAZOLE POLYSULFONIQUES

Les acides carbazole polysulfoniques utilisés comme source de carbone par les bactéries sont synthétisés à l'aide du protocole suivant :

0,03 moles de carbazole (Merck 820255) partiellement dissous dans 60 ml de tétrachlorure de carbone CCl_4 (Prolabo 22520290) réagissent avec 0,12 moles (10 ml) d'acide chlorosulfonique HOSO_2Cl (Prolabo 22697290) versé goutte à goutte.

Le milieu est agité en continu avec un agitateur magnétique et la réaction s'accomplit dans un ballon tricol. La durée de la réaction est d'une heure.

La réaction est stoppée par ajout d'eau distillée, l'acide chlorosulfonique étant alors dissocié en acides chlorhydrique et sulfurique.



De plus, l'acide carbazole chlorosulfonique formé est hydrolysé en acide carbazole sulfonique qui se solubilise dans l'eau distillée.

Après avoir séparé la phase aqueuse et organique, elles sont filtrées sur $0,45\ \mu\text{m}$ afin d'éliminer le carbazole en suspension n'ayant pas réagi (filtre $0,45\ \mu\text{m}$ Sartorius 11806 pour la phase aqueuse et filtre $0,45\ \mu\text{m}$ Millipore HVLP04700 pour la phase organique).

La phase organique est concentrée à sec au rotavapor (50°C), le résidu sec est pesé.

La phase aqueuse est aussi concentrée à sec au rotavapor (50°C) afin d'éliminer les acides (en particulier l'acide chlorhydrique formé).

Sont ensuite ajoutés 100 ml d'éther (Prolabo 23811292) afin d'éliminer le carbazole résiduel.

L'éther est ensuite évaporé et le résidu est pesé.

Les deux résidus secs représentent le carbazole n'ayant pas réagi, soluble dans le tétrachlorure de carbone et dans l'eau distillée.

Dans le produit de sulfonation formé sont ajoutés 3 g de chlorure de sodium (Prolabo 27800291).

L'ensemble est repris dans de l'eau distillée puis lyophilisé avec le lyophilisateur HETOSIC CD52.

Entre l'échantillon et le lyophilisateur est placé un piège à potasse afin de neutraliser l'acide chlorhydrique formé (Figure 109).

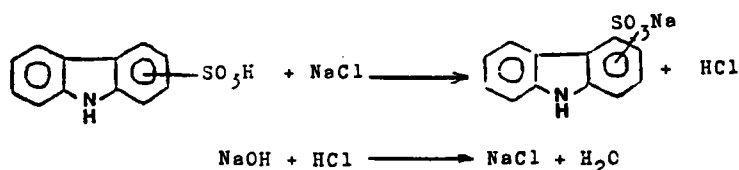


Figure 109 : Réactions de formation du sel d'acide sulfonique et de neutralisation de l'acide chlorhydrique et sa neutralisation.

L'acide carbazole sulfonique est donc lyophilisé pendant 48 heures sous sa forme saline ; quant à l'acide chlorhydrique formé, il est neutralisé avant de pénétrer dans le lyophilisateur HETOSIC CD52.

Cinq techniques analytiques ont été utilisées pour l'identification du produit de synthèse : l'ultraviolet, l'infrarouge, la résonance magnétique nucléaire protonique, la spectrométrie de masse, l'analyse élémentaire %C, %N, %H.

1. L'ultraviolet : le spectre obtenu (Figure 110) a été accompli sur l'appareil KONTRON UVIKON 810 entre 200 et 400 nm (Cuve QS K281/2x HELLMMA) à la concentration de 2 mg/l dans de l'eau distillée.

Le spectre U.V. du produit de synthèse possède des pics d'absorption similaires à ceux du spectre du carbazole. Le spectre du noyau carbazole est ainsi retrouvé. Le produit de synthèse correspond donc à un dérivé du carbazole.

2. L'infrarouge : le spectre infrarouge effectué sur BECKMAN ACCULAB 2, du produit de sulfonation, de 4000 à 200 cm^{-1} dans une pastille de KBr, est représenté par la figure 111.

Le spectre permet d'observer les :

- . absorptions à 1030 et 1200 cm^{-1} caractéristiques des vibrations des liaisons $\text{S} = \text{O}$ des groupements - SO_3H
- . absorptions à 1485 et 1605 cm^{-1} caractéristiques des vibrations des liaisons $\text{C} = \text{C}$ des cycles aromatiques.
- . La large bande d'absorption (3600 cm^{-1} à 2000 cm^{-1}) est due en grande partie aux molécules d'eau piégées par le produit de sulfonation (produit hautement hydrophile). Cette bande d'absorption recouvre les vibrations des liaisons $\text{C} - \text{H}$ aromatiques et à la liaison $\text{N} - \text{H}$ du carbazole.

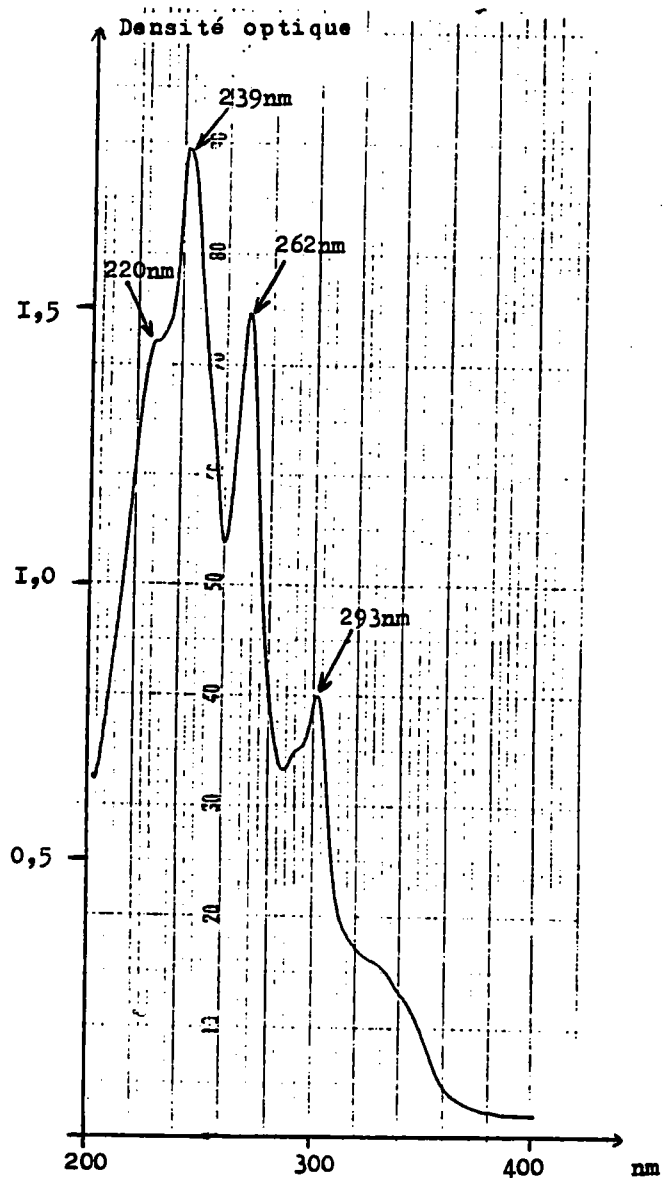


Figure 110 : Spectre U.V. du produit de sulfonation à la concentration de 2 mg/l dans de l'eau distillée.

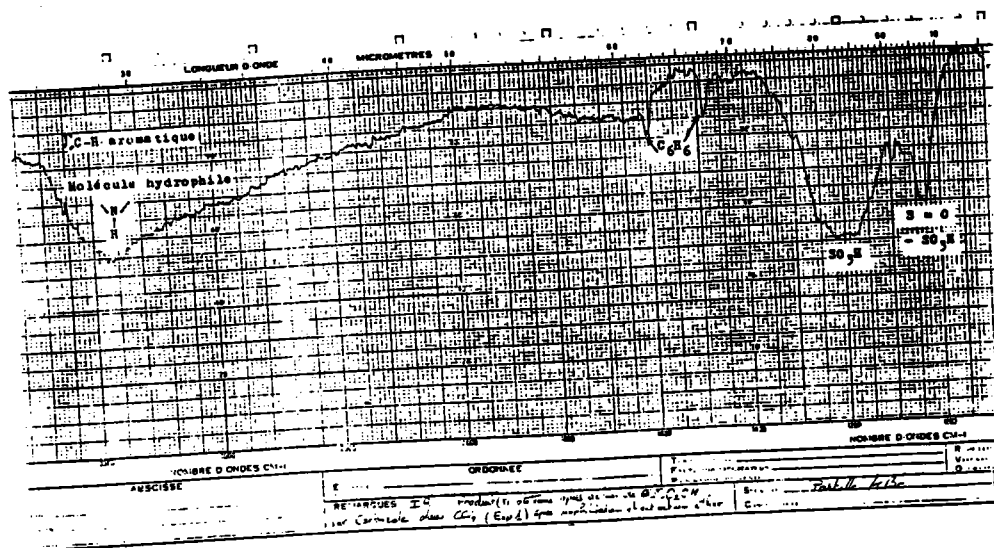


Figure 111 : Spectre I.R. du produit de sulfonation.

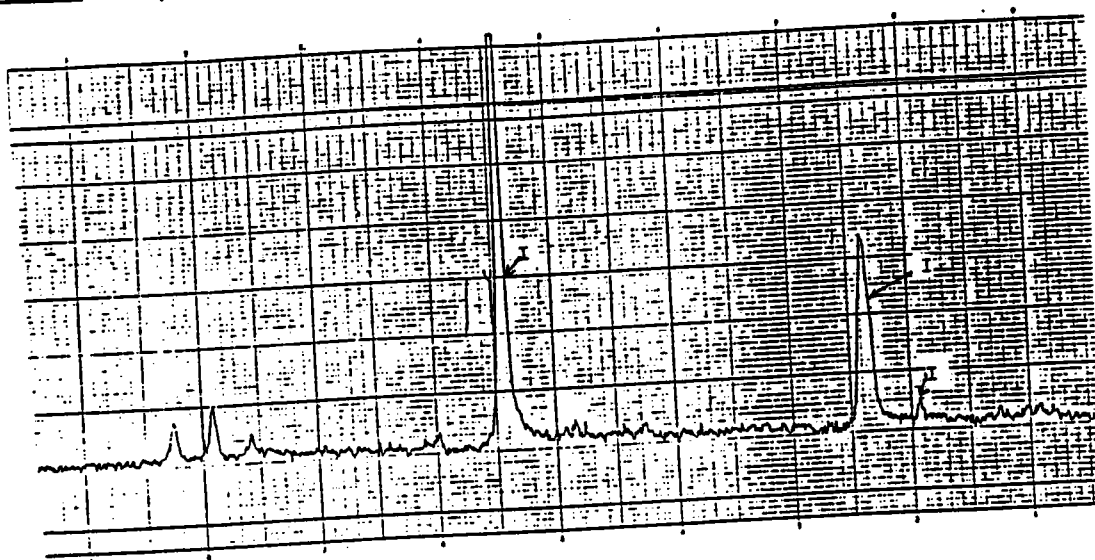


Figure 112 : Spectre RMN du produit de sulfonation dans le solvant DMSO. Les pics I correspondent à des impuretés du solvant.

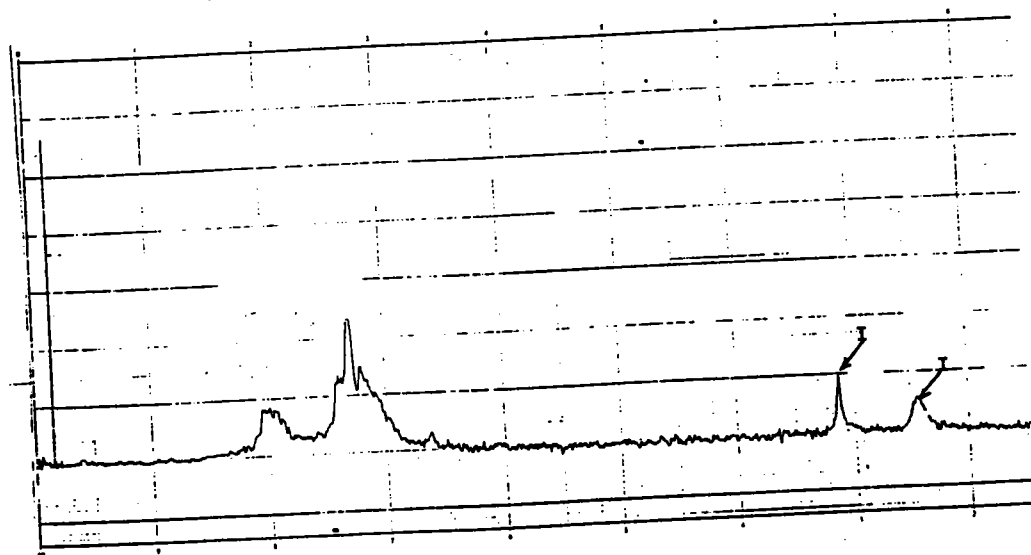


Figure 113 : Spectre RMN du carbazole dans le solvant CD_2Cl_2 - DMSO. Les pics I correspondent à des impuretés du solvant.

3. Résonance magnétique nucléaire protonique : le spectre RMN (Perkin-Elmer R12) du produit de sulfonation a été accompli dans le solvant DMSO (Figure 112).

Ce spectre permet d'observer que le produit de sulfonation possède un haut degré de sulfonation sur les cycles aromatiques (Figure 113).

5. L'analyse élémentaire C%, N%, H% : l'étude centésimale a été menée sur l'appareil CARLO ERBA STRUMENTAZIONE avec la forme saline du produit de sulfonation. Les valeurs observées étaient de : %C = 17,90 et 17,76 ; %N = 1,71 et 1,67 ; %H = 2,93 et 3,15.

Ces résultats prouvent que le noyau carbazole est conservé (12 atomes de carbone pour 1 atome d'azote) ; par contre, ces résultats montrent que la molécule, au moment de l'analyse, était fortement hydratée (25 atomes d'hydrogène alors qu'il ne peut y en avoir au plus que 9 si le produit de sulfonation n'est pas sous sa forme saline). La forte hydratation du produit montre son hydrophilie et explique l'indétermination de son poids moléculaire.

L'ensemble de ces résultats montre que la réaction de sulfonation s'est bien effectuée, que la structure aromatique du carbazole est conservée et que le degré de substitution (même s'il n'a pas été déterminé) est élevé.

La composition du produit de sulfonation n'a pas été déterminé totalement. Il peut donc s'agir d'un mélange de produits polysulfonés.

La cinétique de la réaction de sulfonation a été étudiée dans les mêmes conditions, mais avec des quantités de réactifs et de solvant cinq fois moindres, aux temps différents suivants : $t = 0,5$; 1 ; 2 ; 5 ; 10 ; 15 ; 30 ; 45 et 60 mn de réaction.

Les échantillons sont traités de la même façon, et la masse de carbazole n'ayant pas réagi est mesurée par pesée. L'évaluation de la cinétique de la réaction a été étudiée en déterminant le pourcentage d'acide carbazole sulfonique formé en calculant le rapport massique (masse de carbazole n'ayant pas réagi / masse de carbazole initiale), et ceci en fonction du temps.

Les résultats sont présentés sur la figure 114.

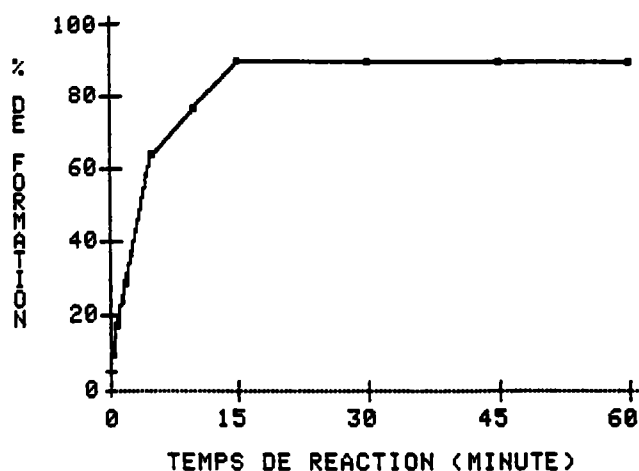


Figure 114 : Evolution du pourcentage de formation de l'acide carbazole sulfonique en fonction du temps de la réaction.

La figure 114 montre que la réaction est achevée au bout de 15 minutes avec un pourcentage de formation du produit de sulfonation de 90%.

L'analyse mathématique montre que le pourcentage de formation du produit de sulfonation Y évolue linéairement en fonction du temps X pendant les cinq premières minutes de la réaction suivant l'équation :

$$Y = 11,90X + 4,727$$

$$r = 0,9992 \text{ significatif à } 0,01\% \text{ pour } n = 4.$$

avec

$$Y = \% \text{ de produit sulfoné formé}$$

$$\text{soit } Y = 100 - \% \text{ de carbazole n'ayant pas réagi}$$

$$\text{soit } Y = 100 - \frac{[\text{carbazole résiduel}]}{[\text{carbazole initial}]}$$

$$\text{soit } Y = \frac{[\text{produit de sulfonation formé}]}{[\text{carbazole initial}]} = [P] f / [C] i$$

$$[C] i = \text{nombre de moles de carbazole utilisées dans la réaction}$$

$$[P] f = \text{nombre de moles de produit formé durant la réaction}$$

avec X = temps de réaction en minutes.

Le modèle $Y = ax+b$ a été accepté par le test du F de Snedecor ($F_{th} = 98,5$; $F_{calc} = 1351$) et par le test du T de Student ($T_{th} = 9,925$; $T_{calc} = 36,75$).

$$[P] f / [C] i = 11,90 \times t(\text{mn}) + 4,727 \quad \Leftrightarrow \quad [P] f = (11,90 \times t + 4,727) [C] i .$$

La réaction de sulfonation est, durant les cinq premières minutes, une réaction d'ordre 0 qui ne dépend, dans l'expression de sa pente, que de la concentration initiale de carbazole.

Le rendement et la répétabilité de la réaction ont été calculés après 10 réactions de sulfonation accomplies dans les mêmes conditions.

Le rendement moyen R_2 de synthèse est de

$$R_2 = 88 \pm 5\%.$$

La réaction de sulfonation est, dans ces conditions, très rapide et s'accomplit avec un très bon rendement.

3.5. LES TENSIOACTIFS

Deux tensioactifs sont utilisés pour augmenter la solubilité du carbazole dans l'eau. Les deux tensioactifs (P94 et P103) sont deux copolymères d'oxyde d'éthylène et de propylène fournis par ATOCHEM (M. BOURALY, Centre d'Application de Levallois 95, rue Danton 92300 LEVALLOIS-PERRET) et conservés à 33°C pour les maintenir à l'état liquide.

Leurs propriétés sont d'une part de solubiliser les hydrocarbures dans l'eau et, d'autre part d'éviter l'adsorption de particules sur les parois de verre des récipients.

Chaque tensioactif est ajouté dans les milieux de culture à raison de 0,25 ml/g de carbazole.

3.6. LES MILIEUX DE CULTURE

3.6.1. LES RAPPORTS C / N / P

Le milieu de culture utilisé a été préparé selon les données rapportées par Davies & Evans (1964), et apporte *at minima* les trois éléments fondamentaux pour la croissance bactérienne = carbone, azote et phosphore. L'importance de ces trois éléments font que les milieux de culture sont généralement définis par les rapports C / N / P.

Les rapports C / N / P sont calculés de la manière suivante :

- . soit m la masse de la source de carbone par litre de milieu de culture (M son poids moléculaire et x le nombre d'atomes de carbone dans la molécule)
- . soit m' la masse de la source d'azote par litre de milieu de culture (M' son poids moléculaire et x' le nombre d'atomes d'azote dans la molécule)
- . soit m'' la masse de la source de phosphore par litre de milieu de culture (M'' son poids moléculaire et x'' le nombre d'atomes de phosphore dans la molécule).

Le nombre de moles de carbone vaut xm/M $X = 12$ pour le carbazole.

L'oxydation d'une mole de carbone requiert une mole d'oxygène O_2 . La masse X d'oxygène consommée pour oxyder le carbone en CO_2 =

$$X = \frac{12 \cdot m}{M} \cdot 32$$

Les rapports C / N / P s'expriment toujours de telle sorte qu'ils correspondent à 100/N/P

tel que $N = m'/X \cdot x' \cdot 14/M' \cdot 100$

et $P = m''/X \cdot x'' \cdot 31/M'' \cdot 100$

3.6.2. LES SOURCES DE CARBONE

Les sources de carbone testées correspondent successivement :

1. au carbazole

2. aux acides carbazole polysulfoniques.

Le degré de sulfonation du carbazole et le pourcentage de chaque produit n'ayant pu être déterminés, les rapports C / N / P sont établis, dans un but de simplification, comme si la technique de sulfonation permettait d'obtenir l'acide carbazole tétrasulfonique exprimé en équivalent (1 mole de carbazole pour 4 moles d'acide chlorosulfonique)

3. à l'acide carbazole monosulfonique.

Pour permettre la croissance de *Proteus vulgaris* souche auxotrophe en présence de l'acide carbazole monosulfonique, le Nicotinamide a été ajouté à raison de 1 mg/l (facteur de croissance) (Merck 6818 0100).

3.6.3. LA SOURCE D'AZOTE

Elle correspond au sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ (Prolabo 21.332.293).

3.6.4. LA SOURCE DE PHOSPHORE

Elle correspond à l'hydrogénophosphate dipotassique K_2HPO_4 (Prolabo 26.930.293).

3.6.5. LES SELS MINERAUX

Deux sels minéraux sont ajoutés dans les milieux de culture :

- . le chlorure de calcium CaCl_2 (Prolabo 22.317.23) à raison de 0,1 g/l
- . le sulfate de magnésium heptahydraté $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck 5886) à raison de 0,3 g/l.

3.6.6. REGLE DE PREPARATION

Pour éviter la précipitation sous forme d'hydroxyde de différents minéraux, le protocole de préparation de 1 litre de milieu de culture doit être le suivant :

A) Pour le carbazole

- 1 - Verser 20 ml d'acide sulfurique H_2SO_4 0,1N (Merck n° 731).
- 2 - Ajouter 750 ml d'eau distillée.
- 3 - Solubiliser successivement $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et CaCl_2 .
- 4 - Ajouter le carbazole.
- 5 - Ramener à pH 7 avec NaOH 0,1N (Merck 6498).
- 6 - Compléter à 1 l avec de l'eau distillée.
- 7 - Stériliser l'ensemble à l'autoclave (121°C sous 2 bars de pression).

B) Pour les acides sulfoniques

Il suffit de dissoudre les acides sulfoniques dans 750 ml d'eau distillée, puis de reprendre le protocole précédent à partir de l'étape 3 sans, bien évidemment, tenir compte de l'étape 4.

3.7. LES METHODES ANALYTIQUES**3.7.1. LES MESURES DE pH**

Les mesures de pH sont effectuées à l'aide d'un pH mètre (Präzisions-pH-Meter E 510) avec une électrode de verre combinée (Métrohm 6.0202.000).

Cet appareil est étalonné à pH 4,00 et 7,00 avec deux solutions tampons (Merck 9435 et Merck 9439 respectivement). Les graduations de l'appareil ayant un pas de 0,05 unité de pH, il est aléatoire de rechercher une plus grande précision.

L'étalonnage de l'appareil, les variations de température du milieu ambiant d'une journée à l'autre sont d'autres sources d'erreur dans la mesure. Cependant, elles se répercutent de la même façon sur l'ensemble des échantillons ainsi que sur le témoin. Ces erreurs n'influent en aucune manière sur les conclusions puisque l'analyse des résultats est de comparer les évolutions du pH des échantillons avec celles du témoin.

Ces mesures ont été effectuées sur les cultures de carbazole en présence ou en absence des tensioactifs ainsi que sur les cultures ayant comme source de carbone l'acide carbazole monosulfonique.

3.7.2. LA TEMPERATURE

Les cultures en fermenteur fermé ont été effectuées dans les conditions moyennes de température : $20^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$.

3.7.3. LES MESURES D'ABSORPTION A 620 NM

Les mesures d'absorbance à 620 nm permettant d'approcher la densité cellulaire sont effectuées au spectrophotomètre KONTRON UVIKON 810 avec des cuves du type HELLMA 100 (ref. 45/100). Elles sont comparées à un milieu de même composition mais sans source de carbone (carbazole ou acide carbazole sulfonique).

En ce qui concerne les milieux de culture ayant le carbazole comme source de carbone, les mesures sont effectuées après décantation du carbazole.

3.7.4. LES MESURES D'ABSORPTION EN ULTRAVIOLET

Afin d'apprécier l'apparition de métabolites capables d'absorber en U.V., les spectres U.V. sont effectués au spectrophotomètre KONTRON 810 entre 190 et 450 nm à l'aide de cuves en quartz type HELLMA 101 - QS 10,00 mm K 282/2x.

Les spectres ont été tracés sur les milieux de culture ayant comme seule source de carbone le carbazole, les mesures ayant été effectuées après sa décantation.

Ces mesures n'ont pas été effectuées sur les cultures ayant l'acide carbazole monosulfonique comme source de carbone, car celui-ci absorbe fortement en U.V. et masque toutes observations.

3.7.5. DOSAGE COLORIMETRIQUE DES HETEROCYCLES INDOLIQUES

Le principe est basé sur la production d'un composé bleu à violet lors de la condensation du dérivé indolique non substitué sur l'azote avec le xanthidrol en milieu acide (Figure 115) (Bartos & Pesez, 1973).

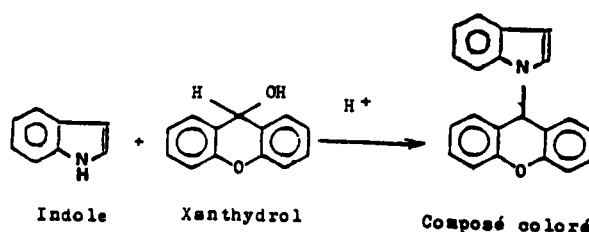


Figure 115 : Réaction de condensation entre l'indole et le xanthidrol.

A 1 ml de solution aqueuse de dérivé indolique sont ajoutés 5 ml de réactif composé d'une solution à 0,02% en poids de xanthidrol (Prolabo 28968104) dans de l'acide acétique glacial (Prolabo 20105292) contenant 1% en poids d'acide chlorhydrique concentré (Prolabo 20248293).

L'ensemble est chauffé pendant 10 minutes à 100°C puis refroidi rapidement dans la glace.

L'acide carbazole monosulfonique peut être dosé par cette méthode comme le montre l'étude d'une gamme étalon de concentration croissante allant de 0 à 1 g/l d'acide carbazole monosulfonique (Figure 116).

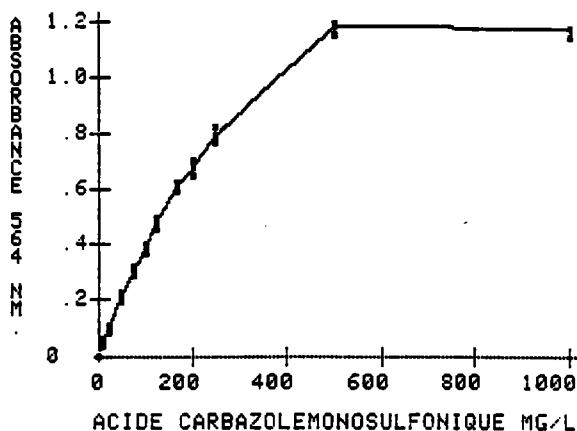


Figure 116 : Evolution de l'absorbance en fonction de la concentration en acide carbazole monosulfonique à 564 nm.

Les mesures d'absorption à 564 nm évoluent de façon linéaire jusqu'à la concentration de 170 mg/l suivant l'équation

$$Y = 8,62 \cdot 10^{-3} X + 3,698 \cdot 10^{-3}$$

$$r = 0,998 \text{ significatif à } 1\% \text{ pour } n = 8.$$

où Y représente l'absorption à 564 nm et X la concentration en mg/l en acide carbazole monosulfonique.

L'ajustement au modèle $Y = AX + B$ a été accepté avec un risque de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{th} = 12,25$; $F_{calc} = 2193,7$) et par le test du T de Student ($T_{th} = 3,499$; $T_{calc} = 46,84$).

L'indole, l'isatine et l'acide carboxy-2 indole ont été dosés de la même manière à 564 nm.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 12.

L'indole et l'acide carboxy-2 indole ont parfaitement réagi avec le xanthidrol pour produire un composé bleu à brun-violet, tandis que l'isatine ne réagit absolument pas et conserve sa coloration initiale (jaune).

Tableau 12 : Equations mathématiques et études statistiques déduites de la réaction de l'indole et de l'acide carboxy-2 indole avec le xanthidrol.

Molécule étudiée	Equation linéaire D.O. = f (concentration)	Coefficient de corrélation r	Test du F de Snedecor	Test du T de Student
Indole	$Y=0,0158X-0,0169$ jusqu'à 80 mg/l	$r = 0,998$ significatif à 0,01 pour $n = 4$	$F_{calc} = 479,3$ $F_{th} = 98,5$ $T=ax + b$ significatif à 0,01	$T_{calc} = 21,89$ $T_{th} = 9,92$ $Y=ax + b$ significatif à 0,01
Isatine	NE REAGIT PAS	Aucune	absorption	à 564 nm
Acide carboxy-2 indole	$Y=1,32.10^{-3}X-2,8.10^{-3}$ 10 jusqu'à 60 mg/l	$r = 0,995$ significatif à 0,01 pour $n = 4$	$F_{calc} = 587,8$ $F_{th} = 98,5$ $Y=ax + b$ significatif à 0,01	$T_{calc} = 24,24$ $T_{th} = 9,92$ $Y=ax + b$ significatif à 0,01

3.7.6. TECHNIQUES DE NUMERATION

Les bactéries ont été numérées par la méthode de comptage sur boîte de Petri après dilution des milieux de culture et croissance sur gélose nutritive.

3.7.6.1. Numération des bactéries autres que *Proteus vulgaris*

1) Préparation du milieu nutritif

Une solution de gélose nutritive (23 g/l d'eau distillée) (Bio Mérieux 51381 pH 6,8) est préparée après avoir été portée à ébullition, puis stérilisée à l'autoclave pendant 20 minutes à 121°C sous une pression de 2 bars.

La gélose en surfusion est ensuite coulée dans des boîtes de Petri stériles de 9 cm de diamètre. Après la prise en masse de la gélose par refroidissement, les boîtes de Pétri sont séchées à l'étuve (37°C).

2) Préparation des tubes de dilution

Après avoir préparé un milieu salé avec NaCl (Merck 6404) dans de l'eau distillée à la concentration de 9 g/l, 9 ml sont introduits à l'aide d'une seringue dans chaque tube à essai. Les tubes ainsi préparés sont ensuite autoclavés dans les mêmes conditions que ci-dessus.

3) Méthode de numération

Un millilitre de culture est prélevé avec une pipette cotonnée et stérile, puis introduit dans un tube de dilution. Plusieurs dilutions de dix en dix sont effectuées jusqu'à la dilution 10^{-10} .

Les numérations bactériennes sont effectuées par étalement de 0,1 ml des différentes dilutions sur la gélose (3 boîtes de gélose par dilution).

Les boîtes de gélose sont ensuite incubées pendant 48 heures à $20 \pm 3^\circ\text{C}$. Le comptage est réalisé à partir des boîtes de Petri sur lesquelles peuvent être comptées 30 à 300 colonies. Les résultats sont ensuite exprimés en unités formant colonies par millilitre (UFC/ml) affectés de leur limite de confiance à 95% (Block & Schwartzbrod, 1982).

3.7.6.2. Numération de la bactérie *Proteus vulgaris*

La technique utilisée est identique à la précédente. Seule la gélose utilisée est différente et correspond à de l'agar lactosé au bleu de bromothymol (Biomérieux n° 1639). La préparation de ce milieu sélectif nécessite une dissolution complète de l'agar dans de l'eau distillée (41 g/l) en l'amenant à ébullition, puis une stérilisation à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C sous 2 bars de pression. L'agar contient du lactose dont la dégradation en acide est mise en évidence par l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol.

Le virage de l'indicateur au vert bleu de la colonie *Proteus* est bien visible après incubation en boîtes de gélose pendant 24 heures à 37°C .

Les unités formant des colonies de *Proteus vulgaris* sont ainsi très facilement mises en évidence. Les résultats sont exprimés en UFC/ml (Unité Formant Colonie).

3.7.7. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES BACTERIES

La technique d'isolement et d'identification des bactéries est la suivante :

Les dilutions de 10^{-1} à 10^{-5} sont effectuées avec 1 ml de chacune des cultures dans de l'eau salée à 0,9% (NaCl Merck 6404) et sont étalées sur gélose (Biomérieux 56381 pH 6,8) à raison de 0,1 ml par boîte de Petri. Les géloses sont ensuite mises à incuber 48 heures, à température de $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

Pour chaque culture, une boîte de Petri contenant de 30 à 300 colonies bactériennes est sélectionnée. Cette boîte est divisée en 208 quadrats de 0,5 cm de côté (les quadrats ayant une surface plus faible à cause des bords de la boîte, ne sont pas pris en compte) et 68 quadrats sont échantillonnés de façon systématique en suivant une progression arithmétique de base 2 et de raison 3. Les colonies sont repiquées deux fois sur gélose, puis sont conservées sur gélose inclinée à température ambiante.

L'identification des souches ainsi isolées est réalisée avec la mise en évidence des activités biochimiques des microorganismes grâce à la galerie API 20B (API SYSTEM FRANCE) et grâce à

des tests comme la métabolisation du lactose et du lévulose, la mobilité des microorganismes et l'observation microscopique après coloration de gram.

La clé dichotomique de Baleux (1976) a permis de définir le nom de genre des bactéries, noms qui ont été confirmés avec le Bergey's Manual (9ème Edition 1984).

3.7.8. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS AVANT ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES

3.7.8.1. Les échantillons de milieu de culture ayant le carbazole comme substrat

Le traitement des échantillons débute par une filtration grossière sur préfiltre millipore type AP 2004700 prévu pour laisser passer des particules de 7 μm . Cette filtration appliquée pour éliminer le carbazole en suspension est suivie d'une filtration sur filtre 0,45 μm (millipore HAWP04700) afin d'éliminer les bactéries inhibées par ajout préalable de 80 mg/l de HgCl_2 (Merck 4419). L'ajout de HgCl_2 est nécessaire pour bloquer toutes les réactions de biodégradation qui pourraient se poursuivre après réalisation du prélèvement. Un test de croissance sur boîte de Petri a montré que l'inhibition des bactéries était totale. L'échantillon reste donc dans le même état et n'évolue plus.

La phase solide SI est recueillie, séchée à 60°C à l'étuve puis pesée avec précision. La phase liquide LI est concentrée puis lyophilisée pendant 36 heures sur le lyophilisateur HETOSIC CD52. La lyophilisation est une phase importante car elle permet d'effectuer des extractions, avec solvants organiques sur le lyophilisat, ayant des rendements proches de 100%.

Le lyophilisat est ensuite pesé, puis remis en suspension dans 200 ml de dichlorométhane (Prolabo 25 631 293) en vue de solubiliser les composés non polaires présents dans le milieu de culture comme le carbazole, les impuretés du carbazole, les tensioactifs... La suspension est placée pendant 2 heures sur une table d'agitation à 150 tours/minute afin de faciliter la solubilisation.

Après filtration sur filtre 0,45 μm (Millipore HVLP 04700) la phase solide SII est recueillie, séchée à 60°C à l'étuve puis pesée avec précision. La phase liquide LII est concentrée à sec (LII sec) au rotavapor (30°C). La phase solide SII est remise en suspension dans 100 ml de diméthylformamide (Prolabo 23470 293) en vue de solubiliser les produits polaires. La suspension est placée, de même, pendant deux heures sur une table d'agitation à 150 tours/minute afin de solubiliser plus facilement.

Après filtration sur filtre 0,45 μm (Millipore HVLP 04700) la phase solide SIII, qui ne doit plus contenir que des sels minéraux, est séchée à 60°C à l'étuve, puis pesée avec précision. La phase liquide LIII est concentrée à sec (LIII sec) au rotavapor (80°C).

100 ml de diméthylformamide se sont avérés suffisants pour solubiliser toutes les molécules polaires puisqu'un second essai avec 100 ml de DMF sur SIII ne permet pas d'extraire d'autres molécules.

D'autres solvants comme le tétrahydrofurane, l'éther, l'acétone et l'hexane ne donnèrent pas plus de résultat. Quant au DMSO, il solubilise tous les sels minéraux et ne présente donc pas d'intérêt.

L'ensemble des manipulations est rapporté sur la figure 117 présentée ci-après.

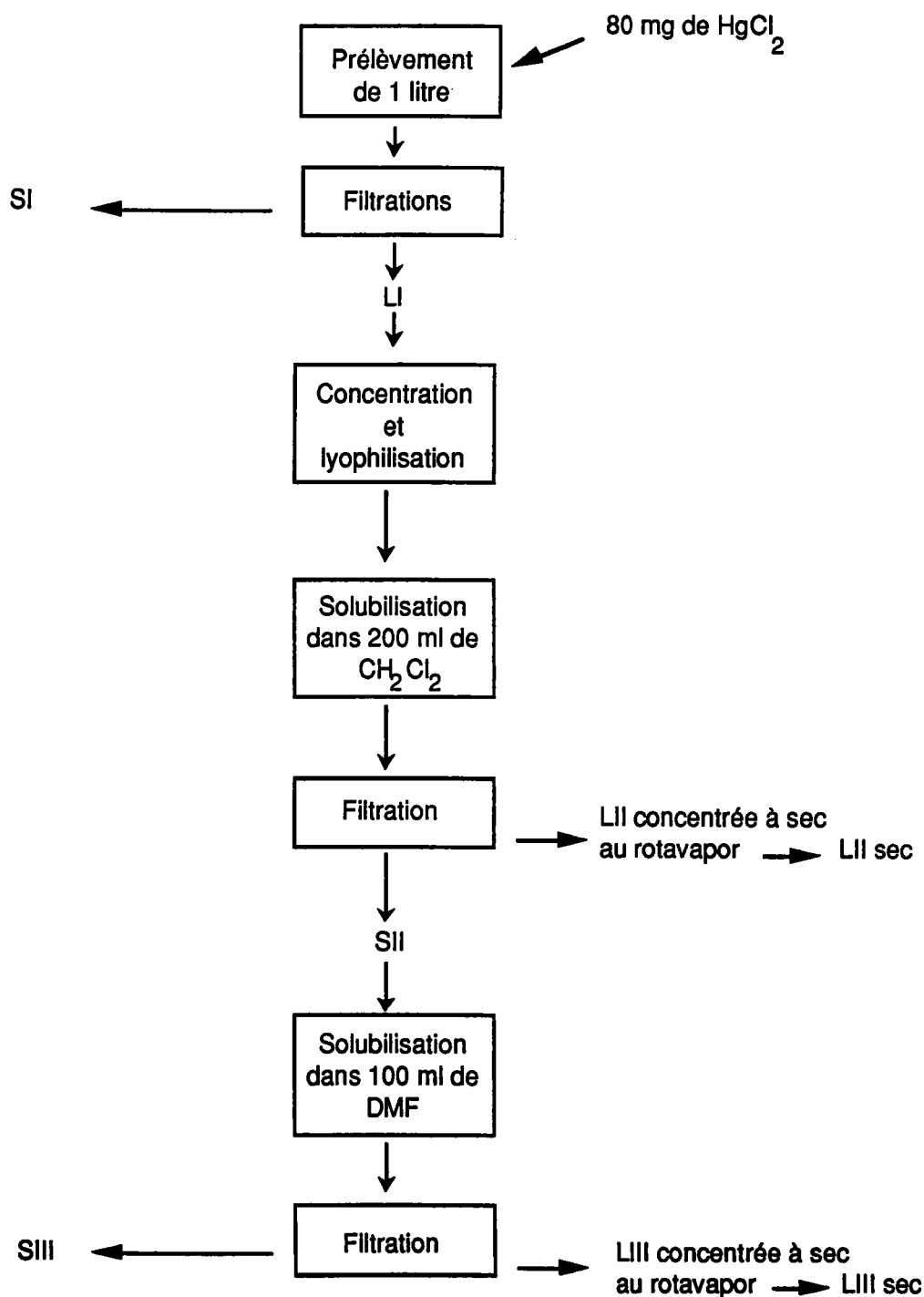


Figure 117 : Description des différentes étapes du traitement des échantillons.

3.7.8.2. Les échantillons de milieu de culture ayant l'acide carbazole monosulfonique comme substrat

Le traitement des échantillons débute par la filtration sur filtre Millipore 0,22 μm (GSWP 04700) afin d'éliminer les bactéries inhibées par ajout de 80 mg de HgCl_2 (Merck 4419).

Le but du traitement étant de préparer les échantillons à l'analyse chromatographique, il est indispensable d'éliminer les composés sulfonés puisqu'il n'est pas possible de dériver les groupements acides sulfoniques pour les analyser en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Il s'avère nécessaire d'utiliser une résine échangeuse d'ions capable d'adsorber les molécules sulfonées et d'éluer toutes les autres molécules (carboxylées, hydroxylées, formylées...) comme doivent l'être les produits de dégradation de l'acide carbazole monosulfonique (cf. 2.7.3.3.).

L'échantillon est purifié par passage sur résine échangeuse d'ions DUOLITE A378 afin d'éliminer l'acide carbazole monosulfonique.

La résine DUOLITE A378 est une résine moyennement basique à structure polystyrénique macroporeuse. Sa fiche technique spécifie :

- . une excellente résistance mécanique et une grande stabilité chimique et thermique,
- . une grande vitesse d'échange,
- . une capacité d'échange satisfaisante dans la majorité des cas,
- . un excellent comportement à l'égard des matières organiques, sa structure lui assurant des propriétés de fixation réversible des matières organiques contenues dans l'eau.

Cette résine est recommandée en déminéralisation de l'eau pour la fixation des anions des acides fortement ionisés (HCl , H_2SO_4 , HNO_3 ...) et la protection des résines fortement basiques situées en aval de la chaîne. Ces propriétés sont rassemblées dans le tableau 14.

Le lavage de la résine s'effectue à l'aide d'un litre de soude à 40 g/l, suivi d'un rinçage avec de l'eau distillée (5 l) et ceci pour 1/2 litre de résine.

L'utilisation de la résine est habituelle : la résine est répartie de façon homogène dans une colonne de verre au bas de laquelle se trouve un robinet régulateur de débit. Le diamètre de la colonne de verre utilisée est de 3,25 cm et la résine repose sur de la laine de verre.

Les échantillons à traiter sont amenés en tête de résine avec un débit (obtenu à l'aide d'une pompe) identique à celui de récupération de l'échantillon élué. Cette technique permet d'éviter deux désavantages :

- 1) la résine n'est jamais asséchée pendant le traitement de l'échantillon,
- 2) le débit étant faible, l'activité de la résine n'est pas perturbée par des problèmes de turbulence.

Cependant, la résine DUOLITE A378 demande de prendre une précaution dans son utilisation. Cette précaution repose sur le choix du volume de résine à utiliser pour le traitement de chaque échantillon.

Tableau 13 : Propriétés physico-chimiques de la résine DUOLITE A378.

. Squelette . Groupements fonctionnels . Aspect . Forme ionique livrée . Densité réelle . Masse volumique apparente . Granulométrie	polystyrénique macroporeux $-N(R)_2$ = environ 85% billes opaques, couleur crème base libre (BL) 1,03 (BL) - 1,05 (CI) environ 680 g/l A 378 : 0,3 à 1,2 mm A 378D : 0,3 à 0,7 mm A378LF : 0,4 à 1,0 mm A378S : 0,4 à 1,0 mm environ 50% (forme BL) + 35% entre BL et CI 1,35 éq/l 0 - 9 60°C (BL) - 100°C (CI) insoluble dans les solutions d'acides et de bases non oxydants et les solvants usuels
. Humidité . Variation de volume maximale . Capacité d'échange totale . Zone de pH opératoire . Températures maximales tolérées . Résistance chimique	

En effet, différentes manipulations (Annexe 2A) ont montré que la résine DUOLITE A378 pouvait adsorber non seulement les composés sulfonés, mais aussi les composés carboxylés (Acide benzoïque Merck 136) et les composés hydroxylés (Phénol Merck 206).

Mais l'adsorption et la désorption évoluent en fonction du substituant anionique des hydrocarbures comme le montre la figure 118, qui résume les résultats effectués par nos soins et présentés en annexe 2A.

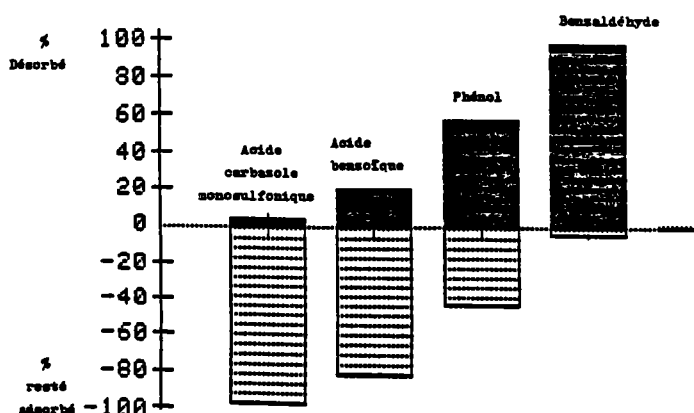


Figure 118 : Représentation graphique du pourcentage désorbé et resté adsorbé après élution avec 1 l d'acide chlorhydrique 2,5N de quantités identiques d'acide carbasole monosulfonique, d'acide benzoïque, de phénol et de benzaldéhyde traités séparément sur 50 ml de résine DUOLITE A378.

Cet histogramme montre nettement que la désorption des composés organiques aromatiques évolue en fonction de la polarité du substituant : $-SO_3H < -COOH < -OH$.

La faible polarité du benzaldéhyde ne semble pas conférer à la résine un quelconque pouvoir d'adsorption de la molécule. Il semble que le benzaldéhyde ne fasse que traverser la résine.

La figure 118 montre que, pour des expériences effectuées dans les mêmes conditions, les différents substituants polaires présentent des affinités différentes avec la résine DUOLITE A378.

C'est pourquoi, après avoir mesuré la capacité d'adsorption de la résine envers l'acide carbazole monosulfonique (Annexe 2B), a été étudiée l'adsorption d'un mélange acide carbazole monosulfonique - acide benzoïque (Annexe 2C). L'ensemble des résultats obtenus a montré que le volume de résine doit être choisi de telle sorte qu'il soit suffisant pour adsorber l'acide carbazole sulfonique de chaque échantillon, mais pas supérieur pour éviter l'adsorption des autres produits.

La résine est donc capable d'accomplir une adsorption sélective des composés sulfonés et une élution des composés carboxylés, hydroxylés et formylés.

La concentration en acide carbazole monosulfonique évoluant en fonction de l'âge de la culture (consommation du substrat par les bactéries), le volume de résine utilisé pour traiter les échantillons varie dans le même sens. Le volume de résine est déterminé en mesurant sur chaque échantillon la concentration en hétérocycles par la méthode au xanthidrol (cf. 3.7.5.) en supposant qu'elle ne mesure que la concentration en acide carbazole monosulfonique. Les mesures ont été effectuées ultérieurement par chromatographie HPLC, les échantillons ayant été congelés.

Cette approximation implique que le traitement des échantillons est mené dans le cas défavorable où il n'y a pas production de métabolites par les bactéries (Tableau 14).

Tableau 14 : Evolution du volume utilisé de résine DUOLITE A378 en fonction de l'âge des quatre cultures étudiées et des rapports C/N/P du milieu de culture.

Age de la culture (j)	<i>Proteus vulgaris</i> 100/20/4	<i>Proteus vulgaris</i> 100/20/0,1	<i>Pseudomonas sp.</i> 100/20/4	<i>Pseudomonas sp.</i> 100/20/0,1
1	25 ml	25 ml	27 ml	23 ml
2	23 ml	23 ml	27 ml	23 ml
3	23 ml	21 ml	27 ml	22 ml
4	22 ml	19 ml	27 ml	22 ml
5	20 ml	14 ml	23 ml	21 ml

L'échantillon, après passage sur la résine, est concentré puis lyophilisé pendant 36 heures sur le lyophilisateur HETOSIC CD52. Le lyophilisat est ensuite pesé, puis remis en suspension dans 100 ml de diméthylformamide (Prolabo 23470293) en vue de solubiliser les composés organiques. La suspension est placée pendant 2 heures sur une table d'agitation à 150 tours/mi-nute afin de faciliter la solubilisation.

Après filtration sur filtre 0,45 mm (Millipore HVLP 04700), le résidu solide qui ne doit plus contenir que des sels minéraux, est séché à 60°C à l'étuve pendant 24 heures puis pesé avec précision. La phase diméthylformamide est concentrée à sec au rotavapor à 80°C.

Le traitement des échantillons est représenté par la figure 119.

3.7.9. LES ANALYSES CHROMATOGRAPHIQUES

3.7.9.1. Dosage du carbazole par chromatographie en phase gazeuse : Technique CPG1

Le dosage du carbazole est effectué sur un appareil INTERSMAT IGC 121 C. Les caractéristiques de la colonne chromatographique capillaire sont les suivantes :

- . phase CPSIL 5
- . longueur 25 m
- . diamètre interne 0,22 mm
- . épaisseur de la phase 0,14 μm .

Les conditions chromatographiques sont les suivantes :

- . pression d'azote (gaz vecteur) à l'entrée : 325 à 350 pa
- . injecteur Spitless : 325°C
- . détecteur à ionisation de flamme : 325°C
- . four : température isotherme à 200°C pendant 10 minutes.

Temps de rétention (RT) du carbazole avec ces conditions chromatographiques :

$$\text{RT} = 6,8 \pm 0,1 \text{ minutes.}$$

Un aliquot pesé très exactement est solubilisé dans 2 ml de dichlorométhane avant d'être injecté dans le chromatographe en phase gazeuse.

Les concentrations en carbazole sont mesurées par rapport à une gamme étalon. Cette gamme étalon est établie pour donner une relation entre la masse de carbazole dissoute dans 1 ml de dichlorométhane (solvant utilisé dans l'expérience) et l'aire des pics chromatographiques obtenus. Il s'avère que l'aire des pics chromatographiques augmente de façon linéaire en fonction de la masse de carbazole dissoute dans le dichlorométhane selon l'équation (Figure 120) :

$$Y = 51915 X + 3926$$

où Y représente l'aire des pics chromatographiques et X la masse de carbazole en mg dissoute dans 1 ml de dichlorométhane.

$$r = 0,9979 \text{ significatif à } 0,01 \quad \text{pour } n = 10.$$

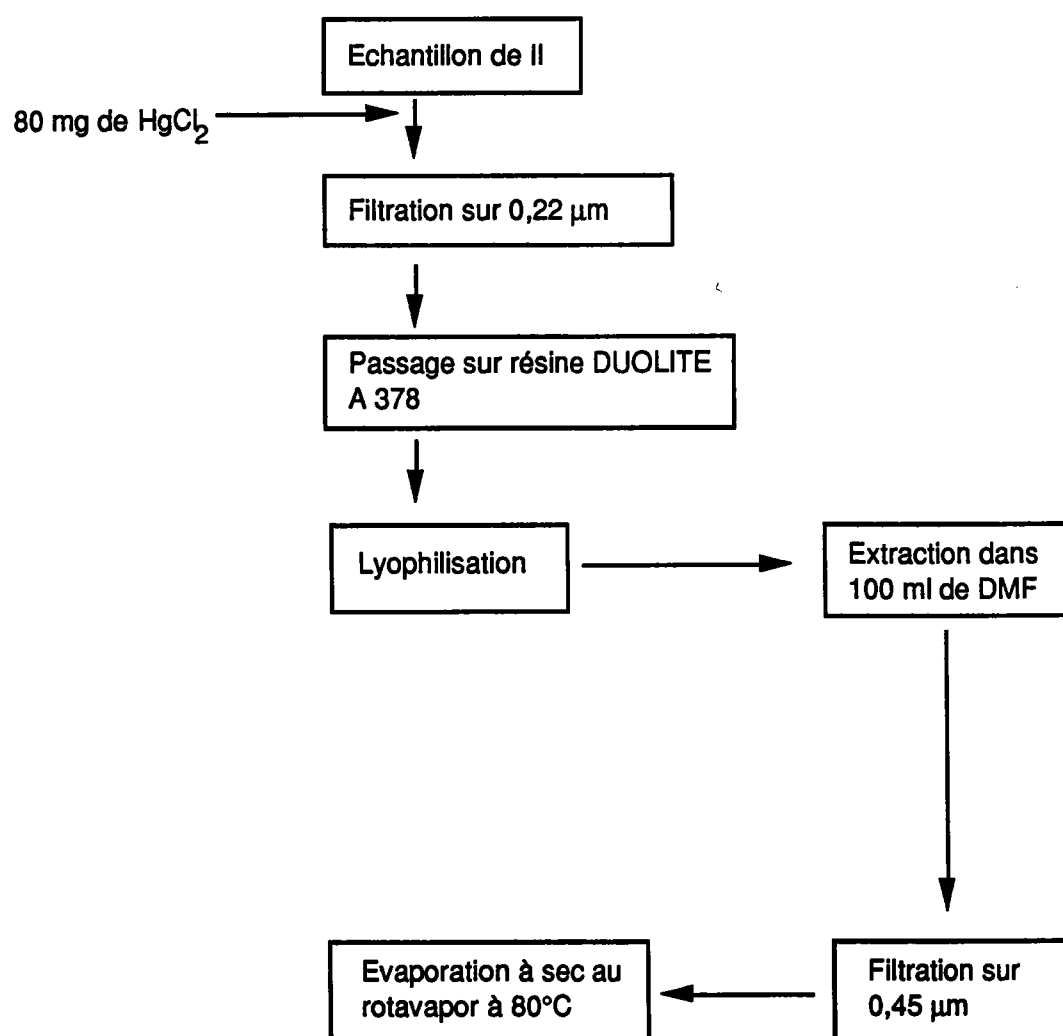


Figure 119 : Description des étapes du traitement des échantillons.

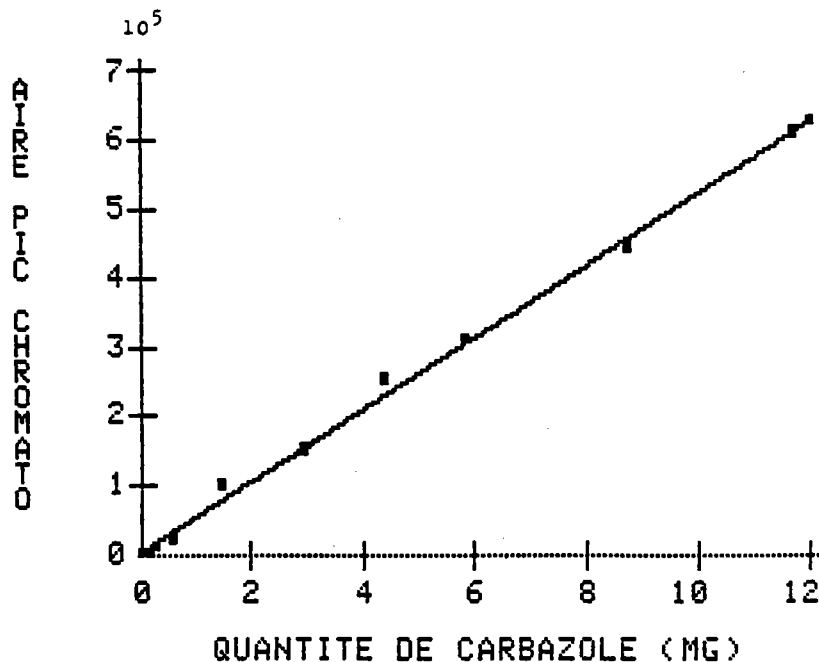


Figure 120 : Evolution de l'aire des pics chromatographiques du carbazole en fonction de la quantité dissoute dans l'échantillon.

L'ajustement au modèle $Y = ax + b$ a été accepté avec un risque d'erreur de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{th} = 7,72$; $F_{calc} = 6229$) et du T de Student ($T_{th} = 2,779$; $T_{calc} = 78,92$).

A l'aide de cette gamme étalon, ont été établies les concentrations de carbazole en suspension et émulsionnées par les bactéries. Cette gamme étalon est une gamme moyenne de 3 valeurs (3 injections) pour chaque échantillon. Une seule gamme suffit puisque tous les échantillons ont été analysés dans la même journée.

3.7.9.2. Dosage du carbazole par chromatographie en phase gazeuse : Technique CPG2

La technique présentée dans le chapitre 3.7.9.1. est utilisée avec deux variantes :

- 1) Les conditions de température du four sont les suivantes :

Température initiale	60°C pendant 5 minutes
Température finale	310°C pendant 20 minutes
Gradient de montée en température	4°C/minute.

Le temps de rétention du carbazole dans ces conditions vaut

$$RT = 31,2 \pm 0,2 \text{ minutes.}$$

- 2) Le dosage quantitatif du carbazole est effectué en ajoutant dans l'échantillon une quantité très exactement pesée de n-décane (Merck 9603) comme étalon interne. L'analyse de la composition des échantillons est effectuée par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse, suivant la technique présentée dans le chapitre 3.2.

3.7.9.3. Dosage de l'acide carbazole monosulfonique

L'acide carbazole monosulfonique est quantifié par chromatographie HPLC (Merck LMC system) dont la colonne chromatographique est du type Lichrosorb RP 18 (7 μ m) de 25 cm de longueur.

Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

- . solvant d'élution méthanol - eau (4/6)
- . débit 0,4 ml/min
- . pression 100 bars
- . longueur d'onde de détection 254 nm.

Trois mesures sur chaque échantillon ont permis d'établir les écarts-types.

Pour une gamme étalon allant de 0 à 125 mg/l d'acide carbazole monosulfonique, les réponses chromatographiques évoluent linéairement en fonction de la concentration suivant l'équation

$$Y = 197958 X - 413975$$

où Y représente l'aire des pics chromatographiques et X la concentration (mg/l) d'acide carbazole monosulfonique.

$r = 0,991$ significatif à 1% pour $n = 6$.

Le modèle $Y = aX + b$ étant accepté avec un risque de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{\text{calc}} = 232,4$; $F_{\text{th}} = 21,2$) et par le test du t de student ($T_{\text{calc}} = 15,24$; $T_{\text{th}} = 4,60$) (Figure 121).

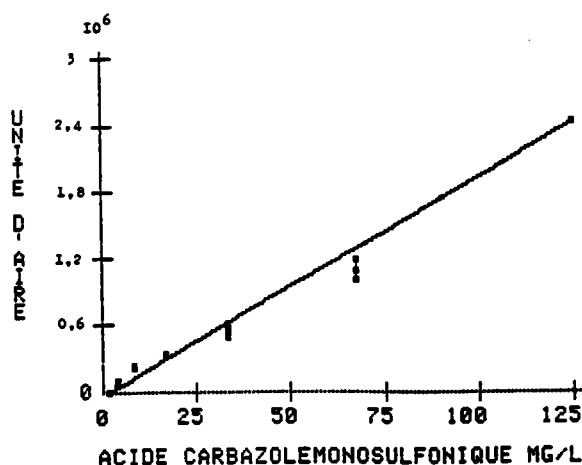


Figure 121 : Evolution de la réponse du chromatographe HPLC en fonction de la concentration en acide carbazole monosulfonique.

3.7.9.4. Techniques chromatographiques d'analyses qualitatives des produits de dégradation

Leur traitement achevé (3.7.8.), les échantillons sont analysés par couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse après leur dérivation par silylation pour étudier les composés hydroxylés et carboxylés. La technique de silylation est similaire à celle utilisée par Badenoch - Jones *et al.* (1982) pour silyler les dérivés de l'indole.

Après avoir dissous dans 400 μ l de pyridine (Merck 7460 +) une masse d'échantillon comprise entre 15 et 25 mg, 1000 μ l de réactif BSTFA (N,O - bis triméthylsilyl) trifluoro-acétamide (Pierce 38828) et 100 μ l de TMCS (triméthylchlorosilane) (Pierce 88531) sont ajoutés. L'ensemble est fermé hermétiquement et chauffé à 60°C pendant au moins 15 minutes.

Les analyses ont été effectuées au service de Spectrométrie de masse du laboratoire du Centre Hospitalier de THIONVILLE, 1 rue Frescaty 57100 Thionville, avec un spectromètre de masse RIBERMAG R-10-10C dans les conditions suivantes :

Colonne chromatographique : phase stationnaire OV 1 de 25 m.

Diamètre externe 0,45 mm

Diamètre interne 0,32 mm,

Epaisseur de la phase : 0,2 μ m,

Injecteur horizontal de Ross : 275°C,

Détecteur : Impact électronique à 70 eV,

Ionisation chimique dans l'ammoniac,

Four : température initiale 130°C pendant 5 minutes

température finale 275°C

montée en température 6°C/minute.

Trois échantillons (phases dichlorométhanes de la culture mixte *Corynebacterium sp.* 3 + *Agrobacterium sp.* 2 des échantillons obtenus après 2, 4, 8 jours d'incubation) ont été analysés sans silylation dans le service de spectrométrie de masse de l'Université de NANCY I, 30 rue Lionnois 54000 NANCY, avec un spectromètre de masse couplé à une chromatographie en phase gazeuse (RIBERMAG R-10-10C) dans les conditions exposées dans le chapitre 3.2.

Les spectres de masse obtenus ont permis d'établir des hypothèses de travail pour identifier les molécules.

3.7.9.5. Analyses quantitatives des métabolites par chromatographie HPLC

3.7.9.5.1. Les étalons

a) L'indole

Le dosage de l'indole est effectué par chromatographie HPLC (Merck LMC system) avec la colonne chromatographique Lichrosorb RP 18 (7 µm) de 25 cm de longueur.

Les conditions d'utilisation sont les suivantes :

- . solvant d'élution méthanol - eau (4/6)
- . débit 0,4 ml/min
- . pression 50 bars
- . longueur d'onde de détection 254 nm.

Deux mesures sur chaque échantillon ont permis d'établir les écarts-types sur les mesures. Les analyses quantitatives pourront être menées après avoir établi une relation entre l'aire des pics chromatographiques et la concentration en indole.

Pour une gamme étalon allant de 0 à 100 mg/l d'indole, les réponses chromatographiques évoluent linéairement en fonction de la concentration suivant l'équation :

$$Y = 81139 X + 356884$$

où Y représente l'aire des pics chromatographiques et X la concentration (mg/l) d'indole.

$r = 0,999$ significatif à 1% pour $n = 6$.

Le modèle $Y = aX + b$ étant accepté avec un risque de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{\text{calc}} = 1541,97$; $F_{\text{th}} = 34,12$) et par le test du T de Student ($T_{\text{calc}} = 39,27$; $T_{\text{th}} = 5,84$) (Figure 122).

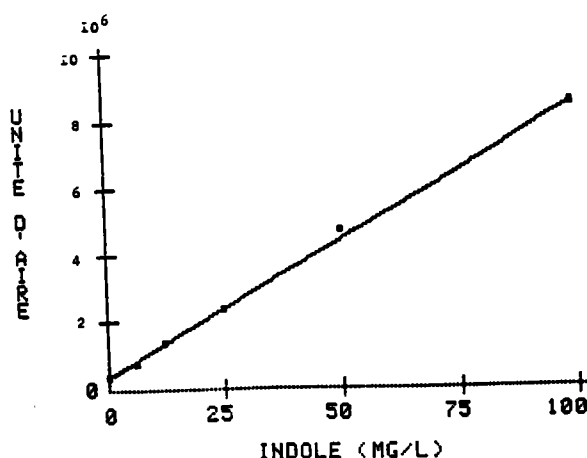


Figure 122 : Evolution de l'aire chromatographique en fonction de la concentration d'indole.

b) L'isatine

Le dosage de l'isatine est effectué dans les mêmes conditions que l'indole. Pour une gamme étalon allant de 0 à 100 mg/l d'isatine, les réponses chromatographiques évoluent linéairement en fonction de la concentration suivant l'équation :

$$Y = 90363 X - 190192$$

où Y représente l'aire des pics chromatographiques et X la concentration (mg/l) d'isatine.

$r = 0,999$ significatif à 1% pour $n = 5$.

Le modèle $Y = aX + b$ est accepté avec un risque d'erreur de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{\text{calc}} = 1673,25$; $F_{\text{th}} = 34,12$) et du T de Student ($T_{\text{calc}} = 40,90$; $T_{\text{th}} = 5,84$) (Figure 123).

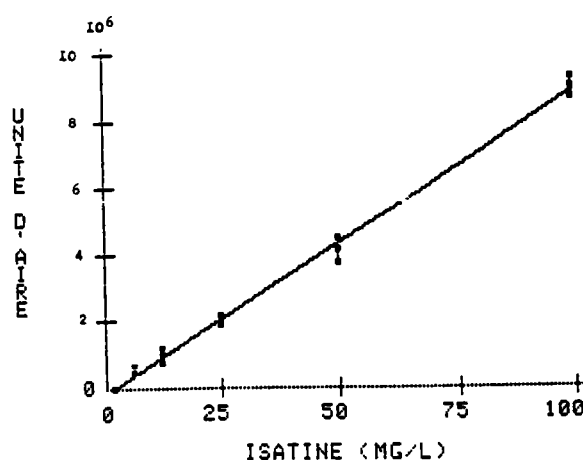


Figure 123 : Evolution de l'aire chromatographique en fonction de la concentration d'isatine.

c) L'acide carboxy-2-indole

Le dosage est effectué de la même manière que l'indole et l'isatine à la variante suivante :

- . débit du solvant d'élution = 0,2 ml/minute
- . pression 25 bars.

Pour une gamme étalon allant de 0 à 100 mg/l d'acide carboxy-2-indole, les réponses chromatographiques évoluent linéairement en fonction de la concentration suivant l'équation :

$$Y = 1225231 X + 1606697$$

où Y représente l'aire des pics chromatographiques et X la concentration (mg/l) d'acide carboxy-2-indole.

$r = 0,998$ $n = 5$ significatif à 0,01.

Le modèle $Y = aX + b$ est accepté avec un risque d'erreur de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{\text{calc}} = 739,85$; $F_{\text{th}} = 34,12$) et du test du T de Student ($T_{\text{calc}} = 27,2$; $T_{\text{th}} = 5,84$) (Figure 124).

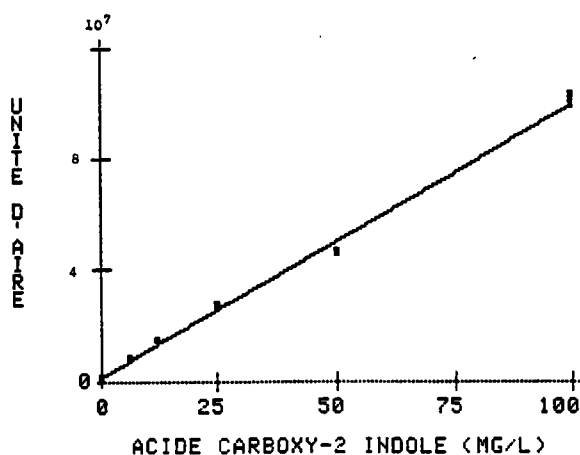


Figure 124 : Evolution de l'aire chromatographique en fonction de la concentration en acide carboxy-2-indole.

3.7.9.5.2. Les échantillons

Le dosage des échantillons est effectué par chromatographie HPLC dans les mêmes conditions que les produits purs du chapitre précédent 3.7.9.5.1.

Les quantifications de l'indole, de l'isatine et de l'acide carboxy-2-indole des échantillons, très exactement pesés, sont effectuées par rapport aux gammes étalons du chapitre précédent.

4. SELECTION et IDENTIFICATION des BACTERIES

4.1. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce chapitre est de montrer que le carbazole, en présence ou en absence des tensioactifs, et ses dérivés de sulfonation, peuvent être utilisés comme source de carbone par certaines bactéries. Ce chapitre présente les différents microorganismes biodégradeurs qui ont été identifiés et leur classification par genre.

Pour des raisons techniques, les acides polysulfoniques ont été utilisés comme substrat carboné pour sélectionner et identifier les bactéries capables de biodégrader les dérivés de sulfonation du carbazole.

4.2. PROTOCOLE

Les souches bactériennes ont été isolées et identifiées à partir de onze cultures réalisées dans onze milieux "nutritifs" différents (Tableau 15) etensemencées avec des populations bactériennes autochtones de six origines différentes (boues activées et sols).

Les cultures ont été conduites sous agitation constante (150 rpm) pendant 14 jours à température ambiante dans des erlenmeyers de 300 ml, bouchés avec du coton cardé, à raison de 150 ml de milieu par erlenmeyer. L'ensemencement initial était réalisé avec 1,5 ml de chacune des suspensions bactériennes décrites dans "Matériels et Méthodes".

Les analyses microbiologiques (isolement et identification) ont été réalisées sur des aliquots de chaque culture prélevés au terme de 14 jours d'incubation.

4.3. RESULTATS

Des onze milieux de culture étudiés, ont été isolées 48 souches bactériennes différentes (Tableau 16) correspondant à un total de six genres et de 34 espèces simplement caractérisées par un numéro 1, 2, ..., n (l'identification n'ayant pu être poussée plus avant).

Les caractéristiques biochimiques qui ont permis leur identification sont rassemblées en Annexe 5.

Six genres différents de bactéries ont été identifiés dans les cultures (n° 1 à 8) ayant comme seule source de carbone le carbazole. La répartition de chacun des genres (répartition exprimée en pourcentage par rapport au nombre total de souches isolées et identifiées dans les huit cultures) est représentée sur la figure 125.

Flavobacterium apparaît comme le genre dominant (47% des souches identifiées appartiennent à ce genre) sur l'ensemble des huit culturesensemencées quelle que soit l'origine des populations utilisées (boues activées et échantillons de sol du site industriel de Marienau).

Tableau 15 : Conditions de réalisation des culturesensemencées avec des populations bactériennes autochtones en vue d'une utilisation ultérieure.

N° des cultures	Source de carbone	Concentration de la source de carbone (g/l)	Rapport C/N/P	Origine des bactéries
1	Carbazole	0,5	100/100/20	BA1
2	Carbazole	2	100/25/5	BA1
3	Carbazole	10	100/5/1	BA1
4	Carbazole	10		BA2
5	Carbazole	50	100/1/0,2	BA2
6	Carbazole	10	100/5/1	M1
7	Carbazole	10		M2
8	Carbazole	10		M3
9	Carbazole en présence des tensioactifs	10		BA1
10	Carbazole en présence des tensioactifs	10		BA2
11	Acide carbazole polysulfonique	10		BA3

Tableau 16 : Les différents genres et leur répartition dans onze cultures ayant le carbazole ou l'acide carbazole polysulfonique comme source de carbone.

N° de la culture	Population bactérienne (UFC/ml)	Nom de genre des bactéries identifiées	Nombre de colonies identifiées	% de répartition dans la culture
1	1,25.10 E 4	<i>Flavobacterium sp. 1</i>	67 colonies à la dilution 10 E -1	26
		<i>Flavobacterium sp. 2</i>		19
		<i>Kurthia sp. 1</i>		12
		<i>Kurthia sp. 2</i>		7
		<i>Agrobacterium sp. 1</i>		36
2	1,92.10 E 5	<i>Flavobacterium sp. 1</i>	33 colonies à la dilution 10 E -2	30
		<i>Flavobacterium sp. 2</i>		15
		<i>Kurthia sp. 1</i>		9
		<i>Kurthia sp. 2</i>		3
		<i>Kurthia sp. 3</i>		3
		<i>Agrobacterium sp. 1</i>		40
3	5,5.10 E 6	<i>Flavobacterium sp. 1</i>	33 colonies à la dilution 10 E -2	18
		<i>Flavobacterium sp. 2</i>		18
		<i>Kurthia sp. 1</i>		6
		<i>Kurthia sp. 2</i>		6
		<i>Kurthia sp. 3</i>		6
		<i>Agrobacterium sp. 1</i>		46
4	2,69.10 E 7	<i>Flavobacterium sp. 3</i>	134 colonies à la dilution 10 E -4	7
		<i>Flavobacterium sp. 4</i>		51
		<i>Kurthia sp. 4</i>		42
5	1,06.10 E 8	<i>Flavobacterium sp. 3</i>	53 colonies à la dilution 10 E -5	2
		<i>Flavobacterium sp. 4</i>		58
		<i>Kurthia sp. 4</i>		40
6	6,3.10 E 6	<i>Flavobacterium sp. 5</i>	44 colonies à la dilution 10 E -4	66
		<i>Pseudomonas sp. 2</i>		34

Tableau 16 : Les différents genres et leur répartition dans onze cultures ayant le carbazole ou l'acide carbazole polysulfonique comme source de carbone (suite).

N° de la culture	Population bactérienne (UFC/ml)	Nom de genre des bactéries identifiées	Nombre de colonies identifiées	% de répartition dans la culture
7	2,54.10 E 5	<i>Arthrobacter sp. 1</i>	73 colonies à la dilution 10 E -2	37
		<i>Arthrobacter sp. 2</i>		30
		<i>Flavobacterium sp. 6</i>		33
8	9,7.10 E 5	<i>Kurthia sp. 5</i>	34 colonies à la dilution 10 E -3	3
		<i>Kurthia sp. 6</i>		3
		<i>Pseudomonas sp. 3</i>		6
		<i>Pseudomonas sp. 4</i>		32
		<i>Flavobacterium sp. 7</i>		9
		<i>Arthrobacter sp. 3</i>		9
		<i>Corynebacterium sp. 2</i>		38
9	9,3.10 E 9	<i>Corynebacterium sp. 3</i>	55 colonies à la dilution 10E -7	42
		<i>Agrobacterium sp. 2</i>		58
10	8,7.10 E 9	<i>Flavobacterium sp. 8</i>	61 colonies à la dilution 10 E -7	13
		<i>Corynebacterium sp. 4</i>		28
		<i>Corynebacterium sp. 5</i>		31
		<i>Agrobacterium sp. 3</i>		28
11	13.10 E 7	<i>Pseudomonas sp. 5</i>	48 colonies à la dilution 10 E -5	76
		<i>Pseudomonas sp. 6</i>		12
		<i>Pseudomonas sp. 7</i>		2
		<i>Pseudomonas sp. 8</i>		2
		<i>Pseudomonas sp. 9</i>		2
		<i>Flavobacterium sp. 10</i>		2
		<i>Flavobacterium sp. 11</i>		2

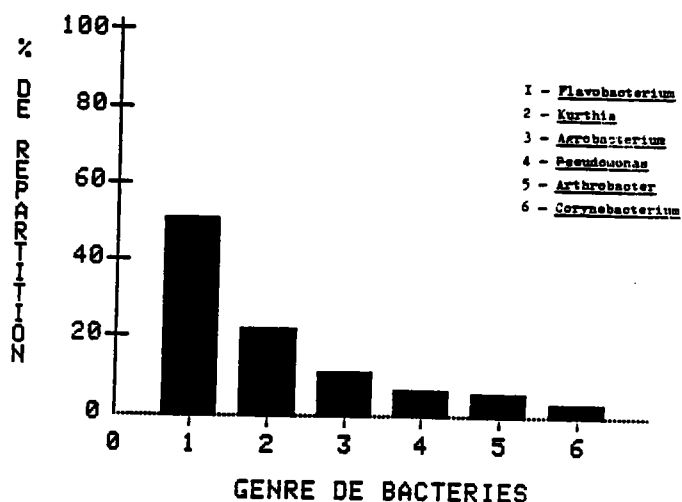


Figure 125 : Répartition des six genres dans les huit cultures (n° 1 à 8) ayant le carbazole comme source de carboneensemencées avec les boues activées (cf Tableau 15).

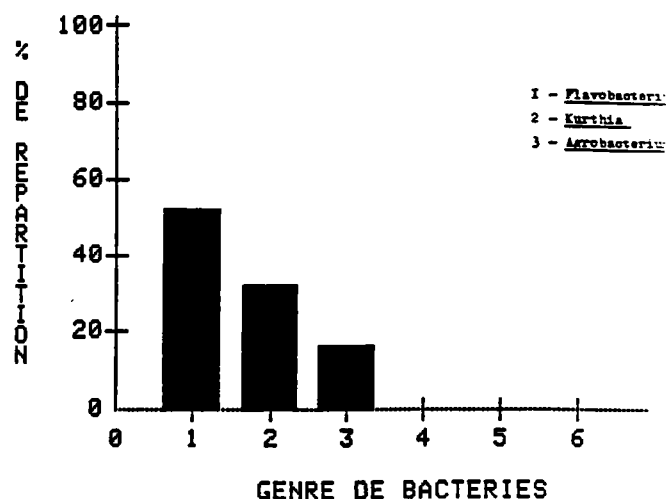


Figure 126 : Répartition des six genres dans les cinq cultures (n° 1 à 5) ayant le carbazole comme substrat,ensemencées avec les boues activées BA1 et BA2 (cf Tableau 15).

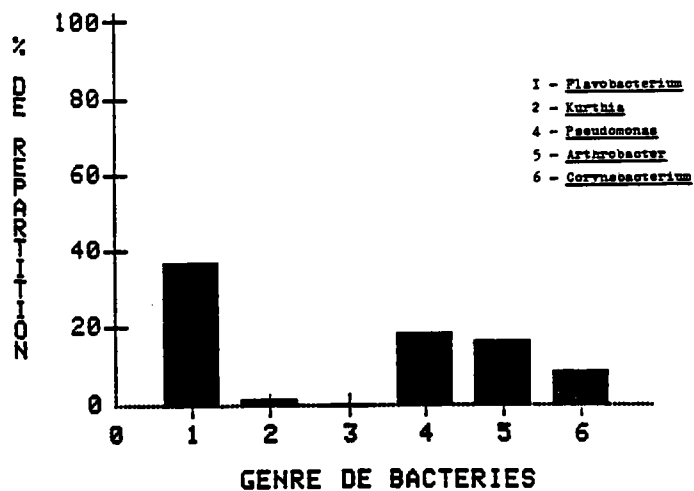


Figure 127 : Répartition des six genres dans les trois cultures (n° 6 à 8) ayant le carbazole comme substratensemencées avec les échantillons de sol M1, M2 et M3 (cf Tableau 15).

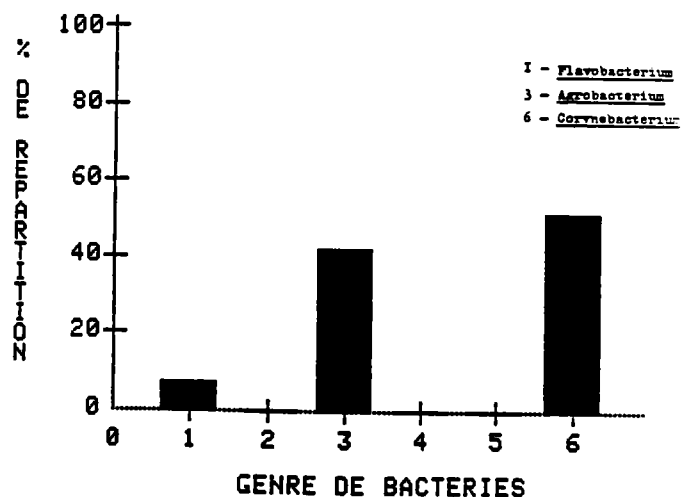


Figure 128 : Répartition des six genres dans les deux cultures (n° 9 et 10) ayant le carbazole comme substrat en présence des tensioactifs,ensemencées avec les boues activées BA1 et BA2 (cf Tableau 15).

La même analyse a été effectuée séparément sur les cultures ensemencées avec les boues activées BA1 et BA2 (Figure 126) et avec les échantillons de sol M1, M2 et M3 (Figure 127).

Quelle que soit l'origine des bactéries, le genre *Flavobacterium* est dominant (52% et 37% des bactéries identifiées respectivement dans les boues activées et dans les échantillons de sol).

Si les genres *Kurthia* et *Agrobacterium* sont spécifiques aux cultures ensemencées avec les boues activées, les genres *Pseudomonas*, *Arthrobacter* et *Corynebacterium* ne sont retrouvés que dans les cultures ensemencées avec les échantillons de sol du site industriel de MARIENAU.

En présence des tensioactifs P94 et P103, 3 genres différents ont été identifiés dans les cultures (n° 9 et 10) ensemencées avec BA1 et BA2 et ayant le carbazole comme source de carbone (Figure 128).

Flavobacterium perd son caractère dominant en faveur de *Corynebacterium* et *Agrobacterium*.

En comparant les milieux n° 3 et n° 9, tous deux ensemencés avec la même population bactérienne sur carbazole (10 g/l), il semble que les tensioactifs P94 et P103 soient toxiques pour le genre *Kurthia* mais favorisent la croissance de *Corynebacterium*, genre non observé dans les milieux de culture sans tensioactifs.

Quant à l'étude de la répartition des bactéries identifiées dans le milieu de culture (n° 11) ayant l'acide carbazole polysulfonique comme substrat, elle a permis de mettre en évidence deux genres différents de bactéries (Figure 129).

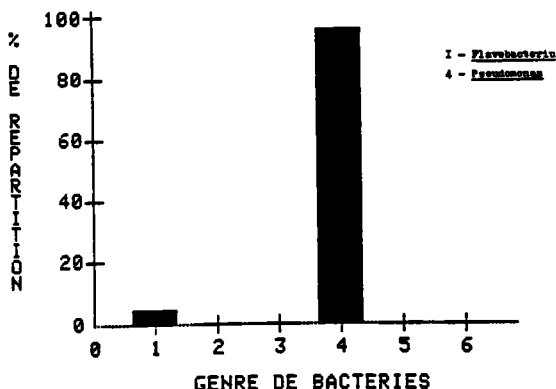


Figure 129 : Répartition des six genres dans la culture (n° 11) ayant l'acide carbazole polysulfonique comme substrat, ensemencée avec les boues activées BA3 (cf Tableau 15).

Les *Pseudomonas* dominants semblent tout à fait adaptés aux dérivés sulfonés. Les autres genres sont minoritaires et, seul *Flavobacterium* a été repéré (4%). Le genre *Flavobacterium*, retrouvé dans toutes les cultures, semble spécifique ou bien adapté à la dégradation du carbazole.

Comme le montre le tableau 17, pour une période d'incubation de 14 jours, la croissance bactérienne est plus importante dans les milieux carbazole + tensioactifs et dans le milieu acide carbazole polysulfonique, en d'autres termes, dans les milieux où le substrat carbazole est le plus biodisponible.

Tableau 17 : Populations bactériennes (UFC/ml) obtenues au bout de 14 jours d'incubation dans différents milieux de culture.

Substrat	Concentration en substrat (g/l)	Population UFC/ml
Carbazole (cultures 3,4,6,7 et 8)	10	0,08 ($\pm$ 0,11).10E8
Acide carbazole polysulfonique	10	1,3.10E8
Carbazole + tensioactif (cultures 9 et 10)	10	90 ($\pm$ 3).10E8

Cependant, dans le cas de l'acide carbazole polysulfonique et pour une même concentration (10 g/l), la quantité de carbone disponible pour la bactérie est plus faible qu'avec le carbazole.

Si le dérivé sulfoné correspond à l'acide carbazole tétrasulfonique, la part du carbone de cette molécule ne représente que 33% de la molécule de carbazole. Il convient donc de rendre les valeurs comparables, de corriger les populations en fonction de ce pourcentage, tel que :

$$1,30.10^8 \times 100/33 = 3,9.10^8 \text{ UFC/ml.}$$

Cependant, malgré cette correction, la croissance bactérienne théorique ($3,9.10^8$ UFC/ml) reste inférieure à celle d'un milieu carbazole + tensioactif. Ce phénomène peut être expliqué par le fait qu'il est possible que les bactéries utilisent une part non négligeable d'énergie pour désulfonner les dérivés du carbazole.

De plus, l'activité biodégradation des bactéries a pu s'exercer aussi vis-à-vis des tensioactifs.

4.4. DISCUSSION

Au terme de ces essais, il apparaît clairement que le carbazole et ses dérivés sulfonés sont biodégradables puisqu'ils autorisent la croissance bactérienne comme le montrent aussi les mesures rapportées au chapitre 5.3. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Bohonos *et al.* (1977) qui ont observé la dégradation du carbazole à l'aide d'une population bactérienne provenant d'un échantillon d'eau de rivière.

D'autre part, il s'avère que les genres *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium* et *Kurthia* sont déjà répertoriés comme étant capables de dégrader les hydrocarbures du pétrole (Austin *et al.*, 1977 ; Walker & Colwell, 1976 ; West *et al.*, 1984 ; Lode, 1986). Seul le genre *Agrobacterium* ne semble pas être connu bibliographiquement, comme étant capable de dégrader les hydrocarbures.

Les genres *Flavobacterium* et *Pseudomonas* ont un caractère dominant respectivement pour le substrat carbazole et acide carbazole sulfonique. Ceci peut s'expliquer par le fait que les deux genres prédominaient peut-être déjà dans les boues activées. En effet, les genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Flavobacterium* peuvent représenter jusqu'à 54% de la population bactérienne cultivable d'une boue activée (Collin *et al.*, 1979).

De plus, il faut signaler que le genre *Pseudomonas* est adapté à l'environnement (Atlas, 1981).

En ce qui concerne le genre *Pseudomonas*, d'autres travaux ont mis en évidence sa capacité à dégrader les composés sulfonés (Hrsak *et al.*, 1982 ; Cain & Farr, 1968 ; Focht & Williams, 1970 ; Brilon *et al.*, 1981a et 1981b). D'une manière générale, il semble d'ailleurs que seuls les genres Gram - soient particulièrement bien adaptés à la dégradation des hydrocarbures sulfonés (cf 2.7.4.3.).

Dans le cas du carbazole, Gram + et Gram - peuvent intervenir dans sa dégradation, même si ces derniers prédominent.

Parmi les genres identifiés, seul *Agrobacterium* semble se développer en fonction de la concentration en substrat carbazole. En effet, *Agrobacterium* affirme son caractère dominant lorsqu'il y a augmentation de la concentration de carbazole en suspension (cultures n° 1, 2 et 3).

En ce qui concerne l'accessibilité du carbazole aux bactéries, les croissances bactériennes montrent que l'ajout de tensioactifs ou la sulfonation de l'hydrocarbure augmentent la biodisponibilité du carbazole. Cependant, l'amélioration de la biodisponibilité permet une sélection plus importante des genres de bactéries capables de dégrader le carbazole.

5. DYNAMIQUE DES CULTURES BACTERIENNES

5.1. OBJECTIF

Ce chapitre se propose de montrer que les cultures bactériennes ayant comme substrat le carbazole ou l'acide carbazole monosulfonique, correspondent à des milieux évoluant en fonction du temps.

L'étude des cultures bactériennes doit permettre :

- de montrer que les bactéries testées sont capables de croître et d'utiliser comme substrat le carbazole et son dérivé sulfoné,
- de mettre en évidence l'intérêt des tensioactifs de synthèse dans les milieux de culture pour favoriser la dégradation du carbazole.

Les résultats obtenus doivent permettre de choisir les conditions qui paraissent les plus intéressantes pour faire en sorte que les bactéries produisent des métabolites dans le milieu de culture lors de la dégradation du carbazole ou de son dérivé de sulfonation.

5.2. PROTOCOLE

Dans ce chapitre, sont présentés successivement les protocoles qui ont permis d'étudier :

- les effets de différents facteurs nutritifs et physico-chimiques sur la croissance bactérienne,
- l'évolution des milieux après ensemencement (nombre de bactéries, substrat, pH),
- les effets des tensioactifs P94 et P103 sur l'évolution des cultures ayant le carbazole comme substrat.

5.2.1. EVOLUTION DES CROISSANCES BACTERIENNES

Cette étude a été effectuée sur les trois cultures (n° 5, 6 et 7) ayant un volume de 150 ml, préparées dans des erlenmeyers de 300 ml fermés avec du coton cardé (Tableau 18).

Après ensemencement avec 1,5 ml de suspension bactérienne, les milieux de culture sont agités à raison de 150 tours/minute à la température de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tableau 18 : Composition des milieux de culture et origine des inoculums d'ensemencement.

Numéro de la culture	Rapport C/N/P	Concentration en acide carbazole monosulfonique (g/l)	Origine des bactéries
5	0/20/4*	0	<i>Proteus vulgaris</i>
6	100/20/4	10	<i>Pseudomonas sp. 5</i>
7	100/20/4	10	<i>Proteus vulgaris</i>

- * Les concentrations en azote et phosphore sont les concentrations qui seraient ajoutées si le milieu contenait 10 g/l de substrat.

Les croissances bactériennes des sept cultures sont suivies par numération des bactéries au temps $t = 0, 2, 5$ et 7 jours après ensemencement.

En parallèle, l'étude a été conduite sur neuf milieux de culture (Tableau 19) de cinq litres, préparés dans des fermenteurs de six litres fermés et stérilisés.

Le réacteur est complété par un système d'agitation continue produite à l'aide d'un moteur BIOLAFITTE, d'une entrée d'air reliée au compresseur du laboratoire (un filtre hydrophobe GELMAN SCIENCES ACRO 50 de porosité $0,2 \mu\text{m}$, réf. 4251, était placé en amont pour stériliser l'air et adsorber les hydrocarbures du compresseur) permettant l'oxygénation des milieux, et d'une sortie reliée à une pompe BIOBLOCK SCIENTIFIC MASTERFLEX permettant de faire les prélèvements dans les milieux.

Les croissances bactériennes sont suivies par numération des bactéries au temps $t = 0, 2, 3, 4, 6$ et 8 jours après ensemencement des cultures ayant le carbazole comme substrat et journalièrement pendant cinq jours pour les cultures ayant l'acide carbazole monosulfonique comme substrat.

5.2.2. DEGRADATION DES SUBSTRATS

* La dégradation du carbazole a été étudiée sur les cultures 8, 9, 10 et 11 (Tableau 19) en mesurant les quantités de carbazole non biodégradées par chromatographie en phase gazeuse (Technique CPG 1) sur les phases SI et LII sec du traitement des échantillons (cf. 3.7.9.1.) du témoin T et des cinq échantillons de 1 litre de milieu de culture prélevés après 2, 3, 4, 6 et 8 jours d'incubation de chacune des cultures étudiées et du témoin N° 8. A chacune des cultures 9, 10 et 11 était testé en parallèle un témoin appelé N° 8 (Tableau 19).

* La dégradation de l'acide carbazole monosulfonique a été étudiée sur les cultures 12, 13, 14, 15 et 16 (Tableau 19) en mesurant les quantités non biotransformées par chromatographie HPLC (cf. 3.7.9.3.) et par spectrophotométrie par la technique au xanthidrol (cf. 3.7.8.1.) sur un aliquot de 1 ml prélevé tous les jours à heure fixe. La seconde technique de dosage étant très rapide, elle permet de poursuivre le traitement des échantillons sans attendre. La première méthode, plus longue à mettre en oeuvre, permet cependant d'obtenir des résultats très précis (beaucoup plus précis qu'avec la méthode au xanthidrol).

Le milieu estensemencé avec une suspension bactérienne de 200 ml provenant d'une culture dont le milieu était de composition identique (Tableau 19). Cette culture, âgée de 7 jours, est centrifugée à 1000 g pendant 20 minutes ; le culot bactérien repris dans de l'eau distillée stérile, est ajouté dans le fermenteur pour conférer à l'ensemble un volume de cinq litres.

En ce qui concerne les précultures avec carbazole, la centrifugation est effectuée sur le milieu après élimination du carbazole par décantation. Après ensemencement, les milieux sont agités à raison de 150 tours/minute à la température de $20 \pm 3^\circ\text{C}$.

Tableau 19 : Composition des milieux de culture et origine des microorganismes.

Numérotation des cultures	Substrat	Concentration du substrat (g/l)	Tensioactifs	C/N/P	PH	Bactéries
8	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,87	nonensemencé
9	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,84	<i>Agrobacterium sp.2</i>
10	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,83	<i>Corynebacterium sp.3</i>
11	carbazole	10	2,5 ml/l P94	100/5/1	6,93	<i>Agrobacterium sp.2</i> <i>Corynebacterium sp.3</i>
12	acide carbazole monosulfonique	5	-	100/20/4	6,52	<i>Proteus vulgaris</i>
13	acide carbazole monosulfonique	5	-	100/20/0,1	6,39	<i>Proteus vulgaris</i>
14	acide carbazole monosulfonique	5	-	100/20/4	6,25	<i>Pseudomonas sp.5</i>
15	acide carbazole monosulfonique	5	-	100/20/0,1	6,42	<i>Pseudomonas sp.5</i>
16	acide carbazole monosulfonique	5	-	100/20/4	6,27	nonensemencé

* L'effet des tensioactifs P94 et P103 sur la solubilité du carbazole a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse (CPG 2) sur les phases LII sec (cf. 3.7.8.1.) de deux milieux stériles de 1 litre de même composition (C/N/P = 100/5/1 ; carbazole 10 g/l ; pH = 6,9) avec et sans ajout des tensioactifs P94 et P103 (2,5 ml/l de chaque).

* Les concentrations du carbazole dissous ont été mesurées sur les cultures 9, 10 et 11 et sur leur témoin N° 8 du tableau 20 sur les cinq échantillons de 1 litre prélevés après 2, 3, 4, 6 et 8 jours d'incubation.

5.2.3. EVOLUTION DES CARACTERISTIQUES DES MILIEUX AU COURS DE LA CULTURE

Cette étude a été menée sur quatorze cultures dont la source de carbone est le carbazole. Elles sont identiques à celles décrites dans le chapitre 5.2.4. (Tableau 20).

La partie soluble des milieux de culture a été étudiée en effectuant un balayage U.V. de 190 à 450 nm sur le spectrophotomètre UVIKON KONTRON. Ce balayage a été effectué dans des cuves en quartz sur un aliquot filtré sur 0,22 μm (filtration sous vide) des cultures âgées de 2, 7 et 14 jours.

Les mesures sont comparées à celles d'un témoin de même composition mais sans substrat (T et T') et à celles d'un témoin eau distillée (To).

5.2.4. EVOLUTION DU pH

Cette étude a été accomplie sur quatorze cultures dont la source de carbone est le carbazole. Elles ont un volume de 150 ml, et sont préparées dans des erlenmeyers de 300 ml, fermés avec du coton cardé.

Après ensemencement avec 1,5 ml de suspension bactérienne, les milieux de culture sont agités à raison de 150 tours/minute à la température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Tableau 20).

Le pH a été étudié par relevé journalier à heure fixe à partir du jour de l'ensemencement et ceci pendant 14 jours. Les mesures sont comparées à celles d'un témoin de même composition, mais sans substrat. De plus, sur ces mêmes cultures, a été étudiée l'absorbance à 620 nm après 14 jours de culture.

L'évolution du pH a été aussi étudiée journalièrement pendant huit jours sur les cultures 8, 9, 10 et 11 du tableau 19, ayant comme source de carbone le carbazole, pendant sept jours sur les cultures 5, 6 et 7 du tableau 18, ayant l'acide carbazole monosulfonique comme substrat.

L'évolution du pH des cultures en présence des tensioactifs P94 et P103 a été étudiée sur quatorze cultures de volume 150 ml et préparées dans des erlenmeyers de 300 ml, fermés avec du coton cardé (Tableau 21).

Après ensemencement avec 1,5 ml de suspension bactérienne, les milieux de culture sont agités à raison de 150 tours/minute à la température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tableau 20 : Composition des milieux de culture et origine des inoculum d'ensemencement.

Numéro de la culture	Rapport C/N/P	Concentration en carbazole (g/l)	Origine de la culture bactérienne
17 (Témoin T)	0/5/1 *	0	BA1
18	100/100/40	0,5	BA1
19	100/50/20	1	BA1
20	100/25/10	2	BA1
21	100/10/2	5	BA1
22	100/5/1	10	BA1
23 (Témoin T')	0/5/1 *	0	BA2
24	100/10/2	50	BA2
25	100/5/1	10	BA2
26	100/2,5/0,5	20	BA2
27	100/1/0,2	50	BA2
28	100/0,625/0,125	80	BA2
29	100/0,5/0,1	100	BA2
17bis (Témoin To)	0	0	BA1

* Les concentrations en azote et phosphore sont les concentrations qui seraient ajoutées si le milieu contenait 10 g/l de substrat.

Tableau 21 : Composition des milieux de culture et origine des bactéries.

Numéro des cultures	Volume des tensioactifs (ml)		Rapport C/N/P	Concentration en carbazole (g/l)	Origine des bactéries
	P94	P103			
30	-	-	0/5/1 *	0	BA1
31	0,2	0,2	0/5/1 *	0	BA1
32	0,4	0,4	0/5/1 *	0	BA1
33	0,8	0,8	0/5/1 *	0	BA1
34	-	-	0/5/1 *	0	BA2
35	0,2	0,2	0/5/1 *	0	BA2
36	0,4	0,4	0/5/1 *	0	BA2
37	0,8	0,8	0/5/1 *	0	BA2
38	0,2	0,2	100/5/1	5	BA1
39	0,4	0,4	100/5/1	10	BA1
40	0,8	0,8	100/5/1	20	BA1
41	0,2	0,2	100/5/1	5	BA2
42	0,4	0,4	100/5/1	10	BA2
43	0,8	0,8	100/5/1	20	BA2

* Les concentrations en azote et phosphore sont les concentrations qui seraient ajoutées si le substrat était à la concentration 10 g/l.

5.3. RESULTATS : ASPECTS CINETIQUES DES CULTURES

Dans le précédent chapitre, seul l'aspect statique des cultures était abordé, puisque les différentes mesures n'étaient réalisées que sur un temps donné d'incubation.

Ce chapitre se propose, par contre, d'étudier l'évolution des cultures bactériennes pour montrer de quelle manière se comportent la croissance bactérienne, la dégradation du substrat et le pH dans les milieux où la source de carbone est le carbazole ou l'acide carbazole monosulfonique.

5.3.1. EVOLUTION DES CROISSANCES BACTERIENNES

Les croissances bactériennes sont étudiées dans les milieux de culture ayant le carbazole ou l'acide carbazole monosulfonique comme substrat.

L'étude de la croissance bactérienne est très importante, puisqu'elle permet de montrer que les bactéries testées sont capables d'utiliser la source de carbone comme substrat.

L'hétérogénéité apparente des essais qui sont regroupés dans ce paragraphe est liée à des raisons historiques ; les conditions optimales de certains essais rapportés ici n'ayant été définies que tardivement.

a) Substrat carbazole

Les croissances des bactéries *Agrobacterium sp.* 2 et *Corynebacterium sp.* 3 ont été étudiées dans les cultures ayant comme substrat le carbazole à 10 g/l (C/N/P = 100/5/1) en présence des tensioactifs P94 et P103 (cultures n° 9 et 10 ; Tableau 19).

Ces souches ont été choisies à partir d'une culture mixte stable précédemment obtenue sur substrat carbazole. Leurs croissances sont représentées respectivement sur les figures 130 et 131.

L'évolution des populations bactériennes se présente en deux phases :

1° La phase de croissance exponentielle qui est achevée après trois jours de culture.

2° La phase plateau, au-delà de trois jours, pendant laquelle les populations n'évoluent plus.

La phase de latence, précédant la phase de croissance exponentielle, n'a été observée sur aucune culture.

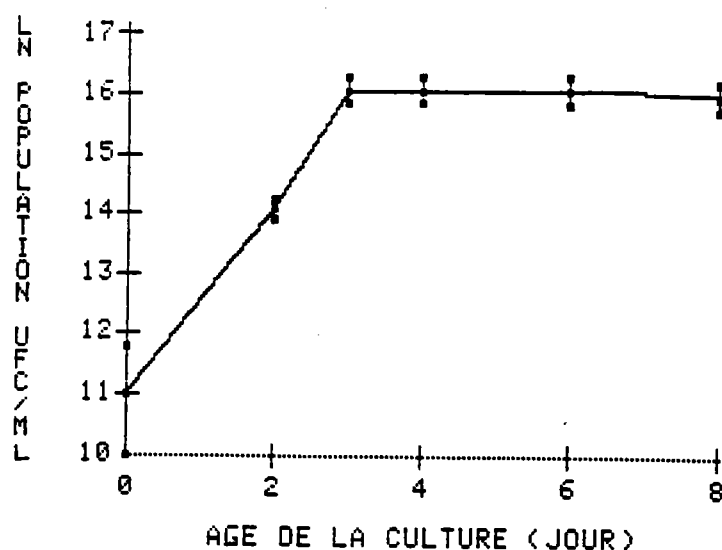


Figure 130 : Evolution de la croissance bactérienne de *Agrobacterium* sp. 2 en fonction du temps. (Concentration en carbazole = 10 g/l, C/N/P = 100/5/1, présence des tensioactifs P94 et P103, population bactérienne dans l'inoculum = $3 \pm 2 \cdot 10^6$ UFC/ml, volume de l'inoculum 100 ml).

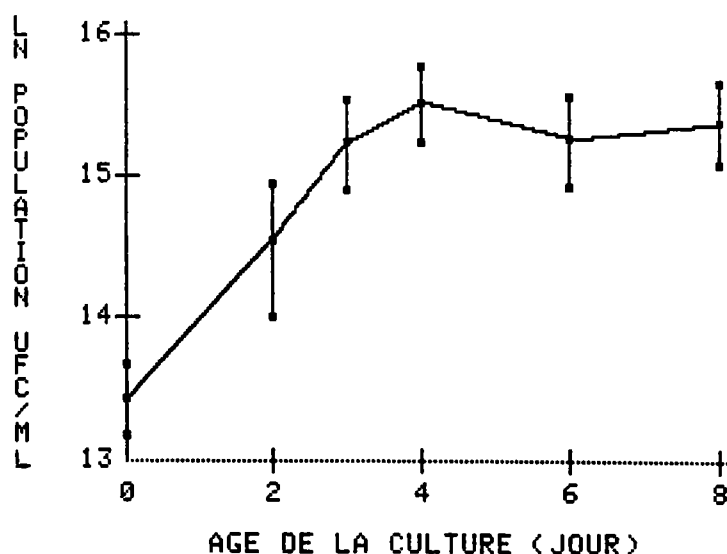


Figure 131 : Evolution de la croissance bactérienne de *Corynebacterium* sp. 3 en fonction du temps. (Concentration en carbazole = 10 g/l, C/N/P = 100/5/1, présence des tensioactifs P94 et P103, population bactérienne dans l'inoculum = $3 \pm 1 \cdot 10^7$ UFC/ml, volume de l'inoculum 100 ml).

La phase de croissance exponentielle est caractérisée par le taux de croissance μ qui correspond à la pente des courbes $\text{Ln}X = f(t)$ dans lesquelles X correspond à la population cellulaire puisque $dX/dt = \mu X$ dans la phase exponentielle.

Pour *Agrobacterium sp. 2* $\mu = 2,0 (\pm 0,4) \text{ j}^{-1}$

Pour *Corynebacterium sp. 3* $\mu = 0,7 (\pm 0,8) \text{ j}^{-1}$

Quant aux temps de génération, ils s'expriment comme l'inverse de croissance μ suivant l'équation $g = \text{Ln}2/\mu$.

Pour *Agrobacterium sp. 2* $g = 8 (\pm 1)/\text{h}$.

Pour *Corynebacterium sp. 3* $g = 24 (\pm 21)/\text{h}$.

Le milieu de culture semble plus favorable à la croissance d'*Agrobacterium sp. 2* qu'à *Corynebacterium sp. 3*.

Le calcul du temps génération g confirme d'ailleurs cette observation.

Parallèlement a été étudiée la croissance de leur culture mixte (*Agrobacterium sp. 2* + *Corynebacterium sp. 3* culture n° 11 ; Tableau 19) dans un milieu de même composition.

La croissance bactérienne est représentée sur la figure 132.

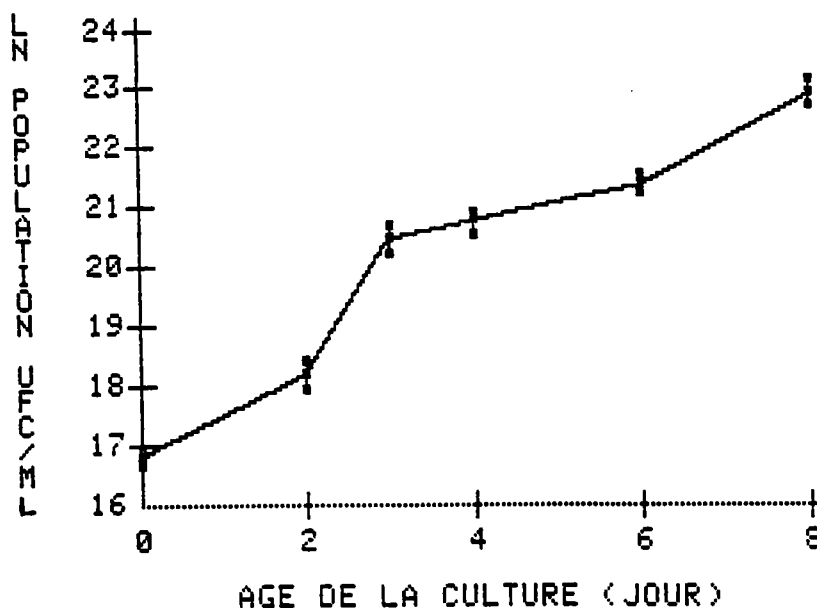


Figure 132 : Evolution de la population bactérienne de la culture mixte *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* en fonction du temps. (Concentration en carbazole 10 g/l, C/N/P = 100/5/1, présence des tensioactifs P94 et P103, population bactérienne dans l'inoculum = $11 \pm 1 \cdot 10^8$ UFC/ml, volume de l'inoculum 100 ml).

La croissance de la culture mixte évolue différemment de celle des cultures pures car, d'une part une phase d'accélération de la croissance est observée les deux premiers jours de culture, et, d'autre part la croissance se poursuit jusqu'au huitième jour de culture, ce qui n'avait jamais été observé avec les cultures pures.

Le taux de croissance μ et le temps de génération g ont pour valeur $\mu = 2,3 (\pm 0,4) \text{ j}^{-1}$ et $g = 7 (\pm 1)/\text{h}$.

Les valeurs obtenues sont équivalentes au taux de croissance et au temps de génération de la culture *Agrobacterium sp. 2*. Cependant, leur croissance en culture mixte montre un effet apparent de synergie puisque la population bactérienne atteint 9.10^9 UFC/ml après huit jours de culture, alors qu'elle ne dépasse pas 10^7 UFC/ml avec les cultures pures.

Les bactéries semblent former une culture mixte capable de dégrader dans de meilleures conditions le substrat carbazole.

Les populations moyennes des cultures,ensemencées avec les cultures mixtes provenant des boues activées BA1 et BA2, et contenant les tensioactifs avec ou sans substrat carbazole, sont rassemblées dans le tableau 22, afin de les comparer entre elles et avec les témoins sans tensioactif et sans substrat.

L'ensemble des résultats culture par culture est rassemblé en Annexe 7.

Le tableau 22 montre que la croissance bactérienne est très importante dans les cultures contenant du carbazole + tensioactifs P94 et P103, alors qu'elle est pratiquement inexistante dans les cultures qui ne contiennent que les tensioactifs.

L'ajout des tensioactifs favorise la dégradation du carbazole, puisqu'après dix jours de culture, les populations bactériennes atteignent 10^{10} UFC/ml, alors qu'elles dépassent rarement 10^7 UFC/ml après quatorze jours de culture sans tensioactif (cf. 4.3.).

En définitive, les évolutions des croissances bactériennes ont permis de montrer que les tensioactifs P94 et P103 :

- augmentent la biodisponibilité du carbazole,
- favorisent du même coup la dégradation du carbazole,
- constituent un équilibre tensioactifs + carbazole qui conserve ses propriétés pendant au moins quatorze jours de culture à toute concentration en carbazole et quelles que soient les bactéries testées,
- ne sont pas toxiques pour les bactéries testées.

Tableau 22 : Evolution des populations bactériennes des culturesensemencées avec BA1 ou BA2 dont la composition varie en fonction de la présence ou de l'absence des tensioactifs et du substrat carbazole.

Numéro des cultures étudiées	Composition en substrat et tensioactif Provenance de l'ensemencement	Population cellulaire (x10 ³ UFC/ml)			
		Après ensemencement	3 jours après ensemencement	7 jours après ensemencement	10 jours après ensemencement
30 et 34	sans tensioactifs et sans substrat Moyenne des résultats avec BA1 et BA2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,3	0,3 ± 0,2
38 à 40	avec tensioactifs et avec substrat BA1	0,8 ± 0,2	6 ± 4 10E2	4 ± 2 10E3	8 ± 5 10E3
41 à 43	avec tensioactifs et avec substrat BA2	4 ± 1	1,3 ± 0,2 10E2	9 ± 6 10E3	3 ± 1 10E4
31 à 33 35 à 37	avec tensioactifs sans substrat Moyenne des résultats avec BA1 et BA2	0,8 ± 0,3	ND	ND	0,7 ± 0,3

N D : Non déterminé.

Etant donné les avantages que présentent les tensioactifs de synthèse, ceux-ci seront utilisés dans les milieux de culture qui seront analysés pour rechercher des produits de dégradation du carbazole (cf. chapitre 6).

b) Substrat acide carbazole monosulfonique

L'analyse de la dégradation de l'acide carbazole monosulfonique est effectuée avec deux autres espèces : *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5*.

En effet, comme le chapitre 6.3.2.2. le montrera, *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* ne produisent pas des métabolites de type indole ; elles ont donc été abandonnées pour ces essais.

Les croissances des bactéries *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* sur le substrat acide carbazole monosulfonique (10 g/l) (cultures n° 6 et 7 ; Tableau 18) et dans les conditions C/N/P = 100/20/4 sont représentées par les figures 133 et 134.

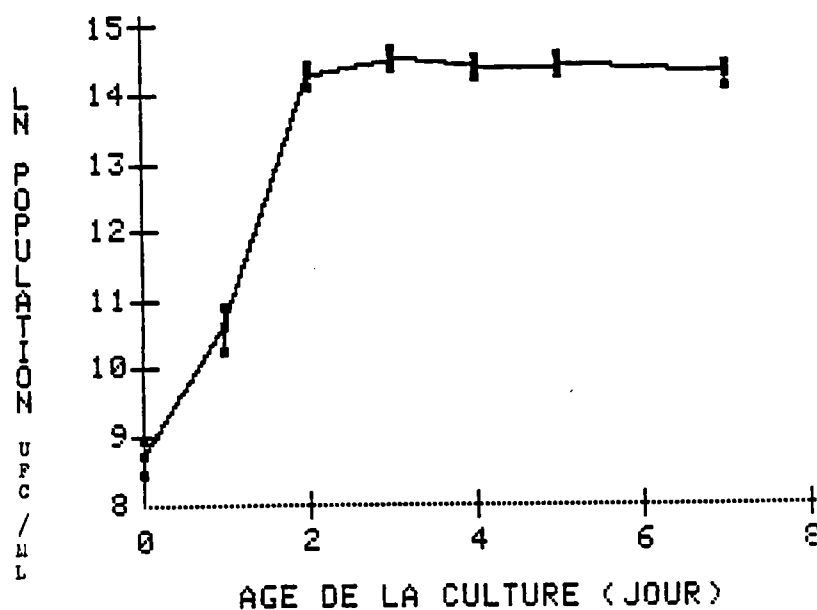


Figure 133 : Evolution de la croissance bactérienne de *Proteus vulgaris* ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) en fonction du temps.

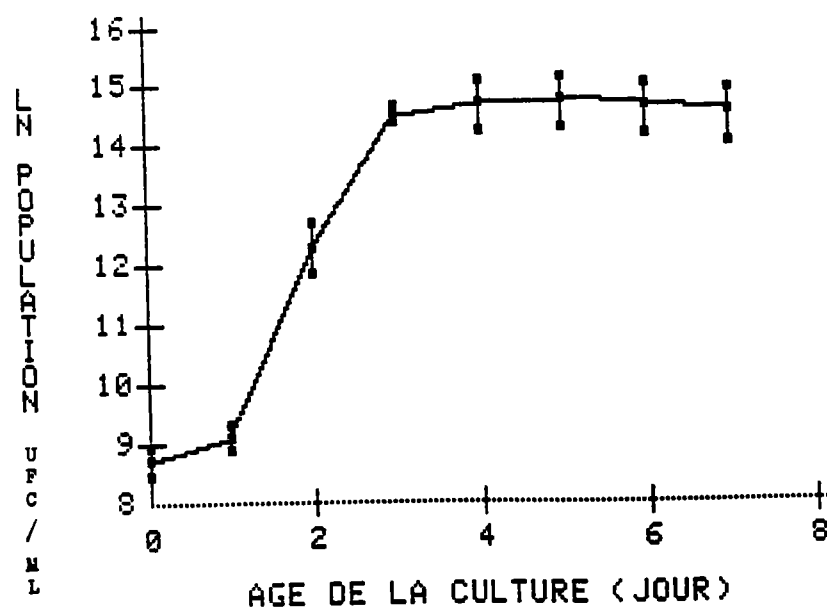


Figure 134 : Evolution de la croissance bactérienne en fonction de l'âge de la cultureensemencée par *Pseudomonas sp. 5* ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Pour un ensemencement initial de 6.10^3 UFC/ml des deux cultures, la croissance est plus rapide pour *Proteus vulgaris* puisque la phase d'accélération n'a pas été observée le premier jour de culture, à l'inverse de la culture ensemencée avec *Pseudomonas sp. 5*.

Cependant, au bout du troisième jour de culture, les deux cultures atteignent une phase plateau qui se situe pour chacune aux alentours de 2.10^6 UFC/ml.

Les croissances bactériennes ont aussi été étudiées sur le même substrat (5 g/l) dans des fermenteurs de cinq litres ensemencés avec *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5*. Deux milieux de compositions différentes C/N/P 100/20/4 et C/N/P 100/20/0,1 ont été testés pour chaque bactérie.

Les croissances de *Proteus vulgaris* (cultures n° 12 et 13 ; Tableau 19) sont représentées sur la figure 135 et celles de *Pseudomonas sp. 5* (cultures n° 14 et 15 ; Tableau 19) sur la figure 136.

En comparant les croissances des bactéries *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* dans les différents milieux étudiés (Figures 133, 134, 135 et 136) plusieurs observations peuvent être faites :

- . dans les fermenteurs de 5 litres, une phase de latence très importante est observée pour les deux espèces bactériennes, à l'inverse des cultures en erlenmeyers. Il est possible que cette phase soit en relation avec la taille des réacteurs et une oxygénation du milieu non contrôlée (Figures 144 et 145) ;

- . les milieux carencés en phosphore semblent présenter un effet légèrement défavorable à la croissance des bactéries puisque la phase de latence est plus importante de 24 heures pour *Proteus vulgaris*, ainsi que pour *Pseudomonas sp. 5* ;

- . la phase exponentielle de croissance débute plus rapidement dans les milieux de culture ensemencés avec *Proteus vulgaris* ; cependant, les cultures ensemencées avec *Pseudomonas sp. 5* rattrapent leur retard les jours suivants.

Les taux de croissance μ et les temps de génération g des quatre cultures (milieu de composition C/N/P = 100/20/4, ensemencé avec *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5*) sont rassemblés dans le tableau 23.

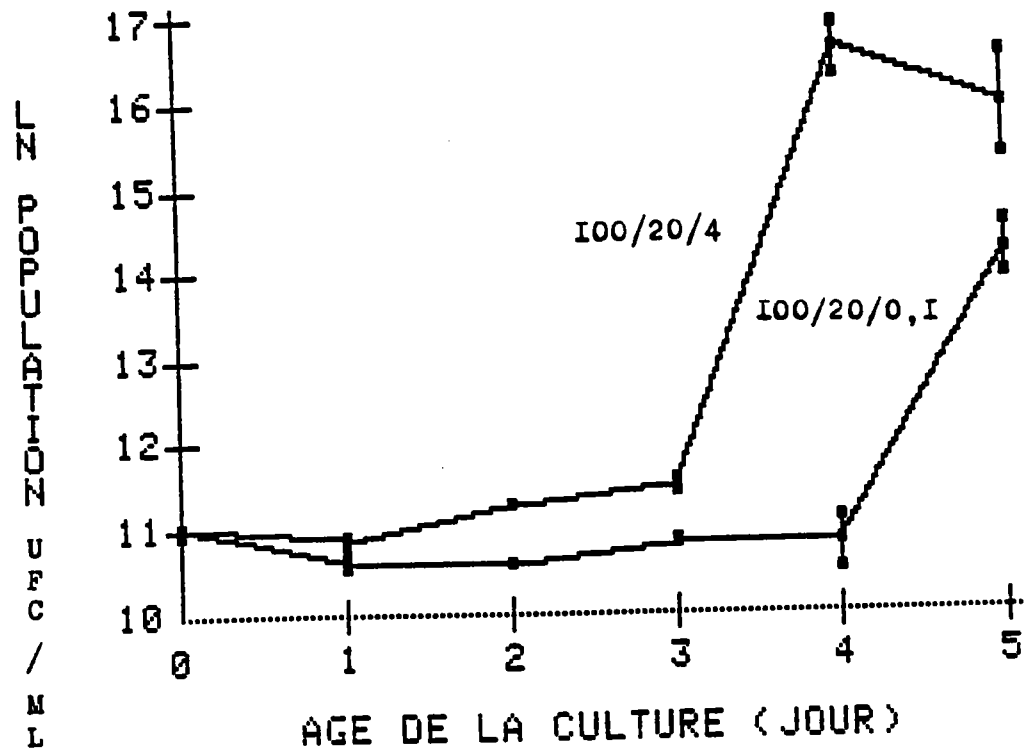


Figure 135 : Evolution de la croissance bactérienne dans deux milieux de composition différente ensemencés par *Proteus vulgaris* (température d'incubation 20 ± 3°C).

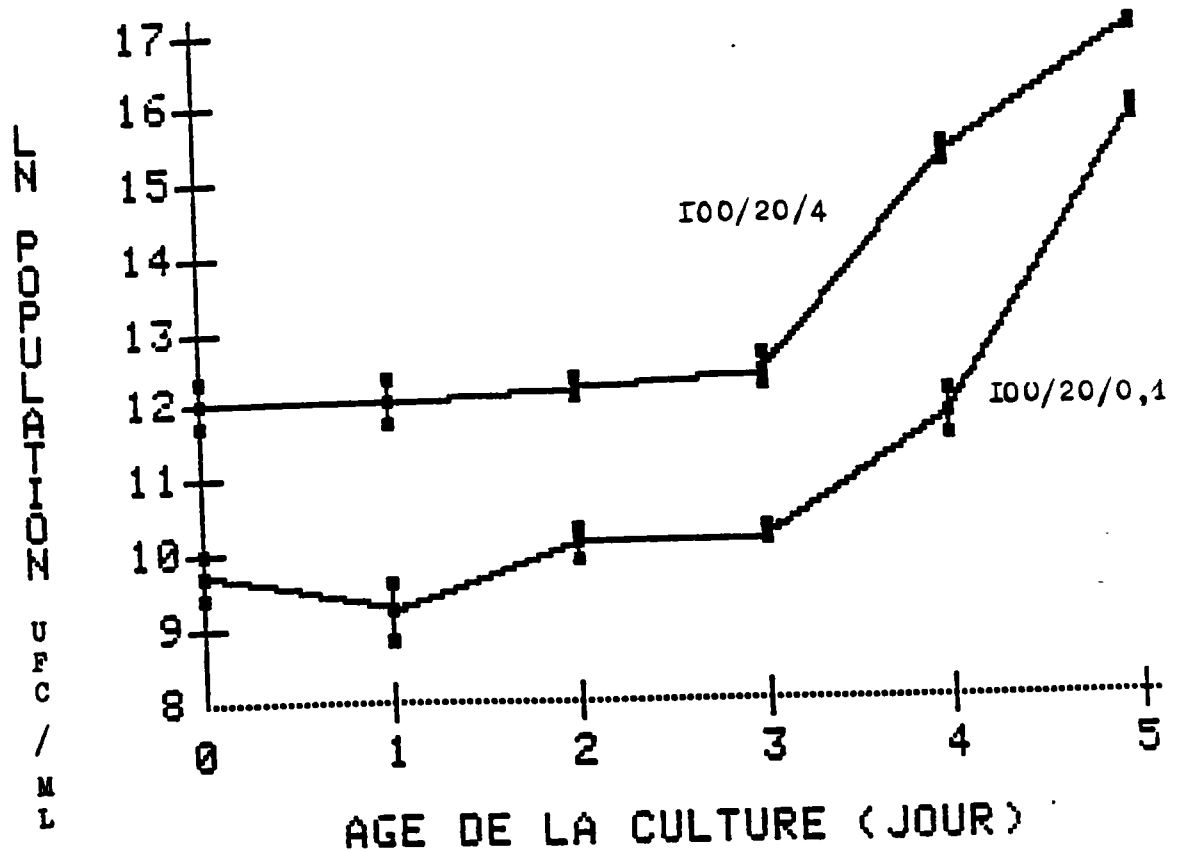


Figure 136 : Evolution de la croissance bactérienne dans deux milieux de composition différente ensemencés par *Pseudomonas sp. 5* (température d'incubation 20 ± 3°C).

Tableau 23 : Taux de croissance μ et temps de génération g .

Microorganismes biodégradeurs	C/N/P	Volume de la culture (ml)	Taux de croissance μ (j E ⁻¹)	Temps de génération g (h)
<i>Proteus vulgaris</i>	100/20/4	150	$3,7 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,7$
		5000	$5,2 \pm 0,7$	$3,2 \pm 0,4$
<i>Pseudomonas sp.5</i>	100/20/4	150	$2,3 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,8$
		5000	$2,2 \pm 0,4$	8 ± 1

Le tableau 23 montre que les taux de croissance des bactéries restent du même ordre de grandeur quel que soit le fermenteur utilisé et quelle que soit la concentration du substrat (10g/l pour les cultures de 150 ml, 5g/l pour les cultures de 5000 ml).

Il apparaît, que le taux de croissance de *Pseudomonas sp. 5* est environ deux fois plus important que celui de *Proteus vulgaris*.

Les taux de croissance des cultures dans les conditions C/N/P 100/20/0,1 n'ont pas été calculés puisqu'il n'a pas été possible d'observer la phase plateau ou de ralentissement sur la période d'étude de cinq jours, la phase de latence ayant été importante.

5.3.2. DEGRADATION DES SUBSTRATS

Ce chapitre a pour but de montrer que les bactéries sélectionnées dans ces études sont capables de dégrader le carbazole en absence et en présence des tensioactifs, et son acide sulfonique.

a) Substrat carbazole

Ce chapitre se présente en trois parties. La première partie présente les résultats obtenus avec une méthode d'analyse simple mais très globale, décrite dans le chapitre 5.2.3. et qui correspond à l'étude de l'évolution de l'absorption U.V. des milieux de culture débarrassés de toutes matières en suspension.

La seconde partie montre l'effet des tensioactifs dans les milieux de culture ayant le carbazole comme source de carbone.

La troisième partie présente des résultats exprimés en quantité de carbazole biodégradé selon la méthode décrite dans le chapitre 3.7.8.1..

a.1.) Evolution de la phase soluble des milieux de culture

L'évolution des quatorze cultures ayant comme substrat le carbazole (Tableau 20) a été étudiée en U.V. après 2, 7 et 14 jours de culture.

Les spectres U.V. des cultures ensemencées avec la culture mixte obtenue après traitement de la boue activée BA1 sont représentés sur les figures 137, 138 et 139, et ceux des cultures ensemencées avec BA2 sur les figures 140, 141 et 142.

Les spectres U.V. des cultures après deux jours de cultures (Figures 137 et 140) sont caractéristiques du spectre U.V. du carbazole solubilisé dans l'eau et biodisponible.

Quant à la forte densité optique observée de 190 à 200 nm, elle est due aux sels minéraux dissous dans l'eau. En effet, cette densité optique élevée a été mesurée sur le témoin T (milieu reconstitué + bactérie, sans carbazole, culture n° 17) et avait pour valeur D.O. = 1,78 tandis qu'elle était très faible dans le témoin To de même composition, mais sans sels minéraux (Figure 149). Le témoin avec carbazole mais sans bactérie n'est pas représenté sur les figures ; cependant, il présente le même spectre que ceux obtenus après 2 jours de culture (Figures 137 et 140).

Les figures 138 et 139 représentent les spectres U.V. des cultures sept jours après leur ensemencement. La comparaison avec les spectres des cultures âgées de deux jours, montre que les milieux ont évolué et que les spectres ne sont plus caractéristiques du carbazole dissous.

Une absorption très élevée (maximum entre 210 et 230 nm) est caractéristique des milieux à 10, 20 et 50 g/l de carbazole en suspension dans lesquels se développe une coloration ocre intense.

Ainsi, les spectres montrent que le carbazole est utilisé comme substrat dans tous les milieux de culture, qu'ils soient ensemencés avec BA1 ou BA2 et que les bactéries excrètent des molécules qui absorbent en U.V. Ces molécules, présentes à l'état soluble dans le milieu de culture, possèdent des sites d'insaturation et peuvent correspondre à des produits de dégradation du carbazole.

Les résultats obtenus ne peuvent pas être liés à des problèmes de décantation. En effet, les spectres sont stables dans le temps. Cela prouve que toutes les particules ont fini de décanter ; quant aux matières en suspension, elles arrêtent obligatoirement toutes les longueurs d'ondes émises et ne peuvent donc absolument pas interférer sur la forme des spectres observés.

Les figures 139 et 142 représentent les spectres U.V. des cultures quatorze jours après leur ensemencement. Comme pour les deux figures 137 et 141, les spectres obtenus ne sont plus caractéristiques du carbazole et la plupart sont caractérisés par une absorption élevée.

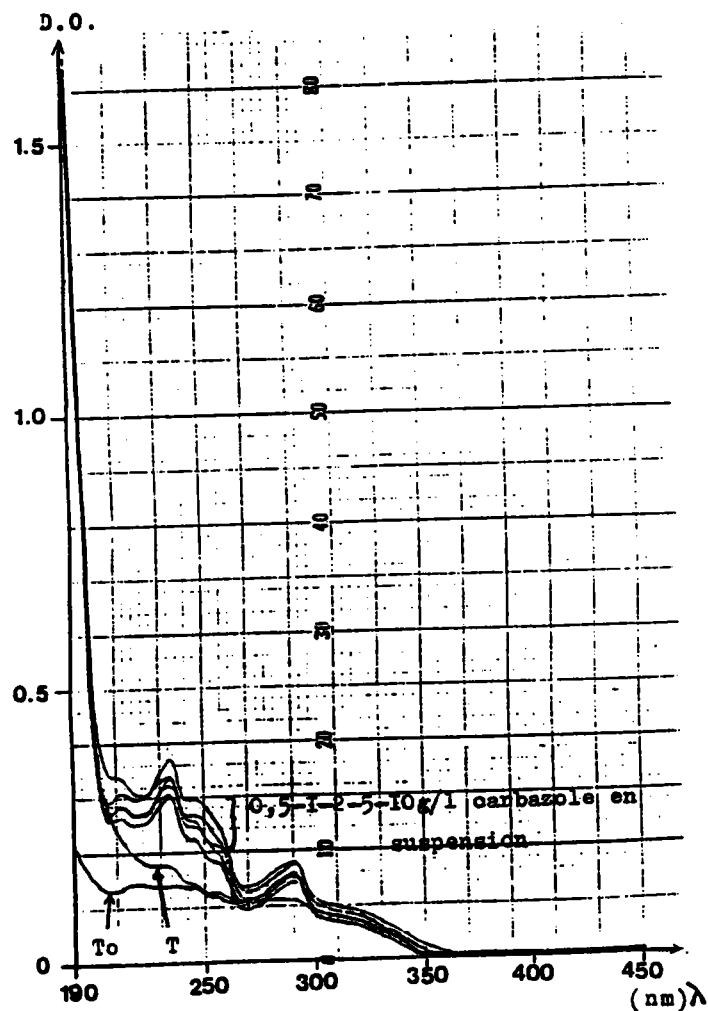


Figure I37 : Spectre U.V. des cultures ayant 0 (témoins T et To)-0,5-1-2-5-10g/l de carbazole en suspension, deux jours après ensemencement.

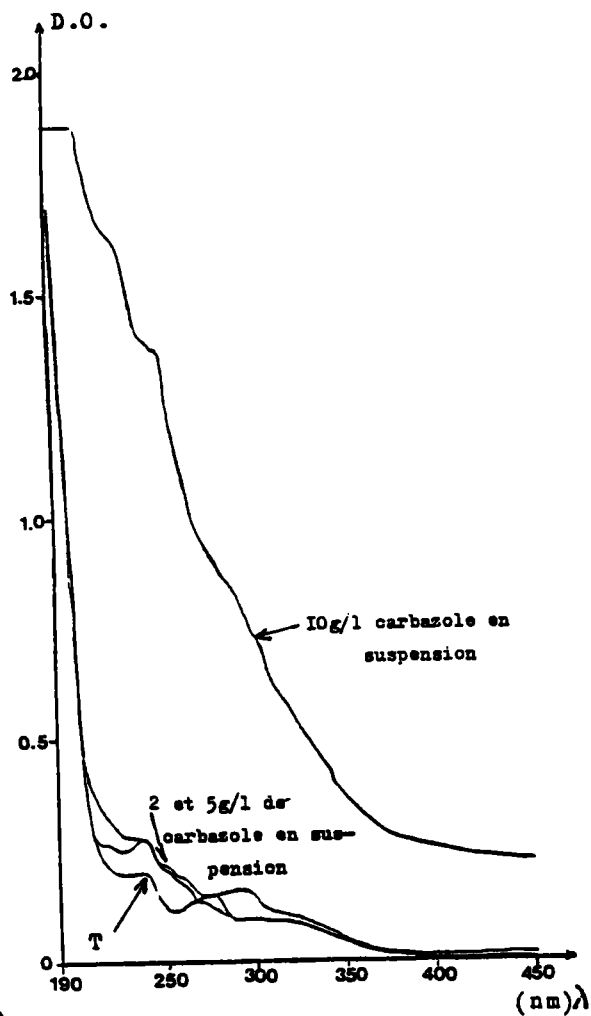


Figure I38 : Spectre U.V. des cultures ayant 0 (témoins T)-2-5-10g/l de carbazole en suspension, sept jours après ensemencement.

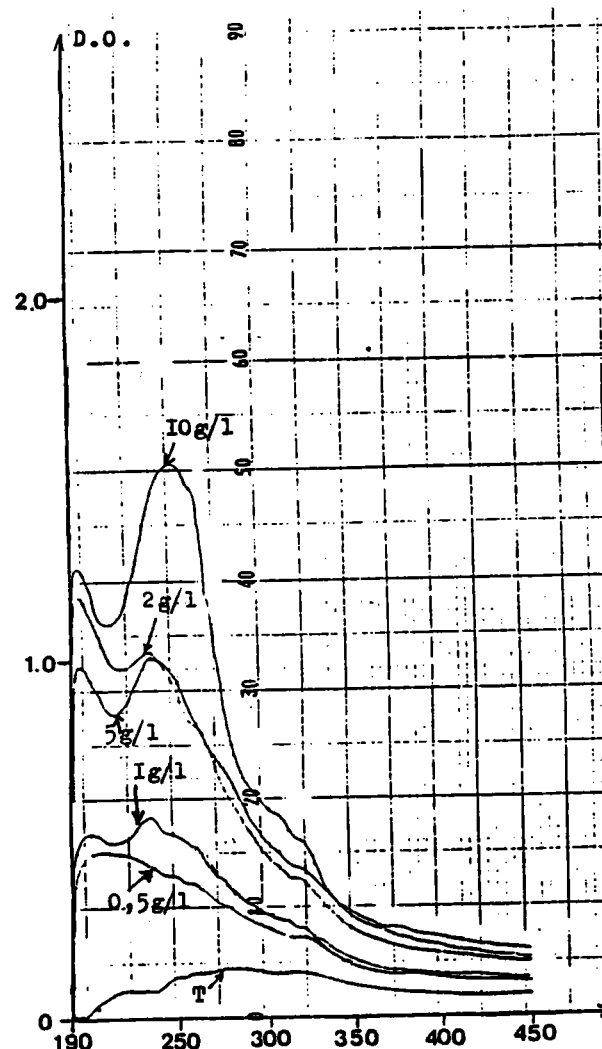


Figure I39 : Spectre U.V. des cultures ayant 0 (témoins T)-1-2-5-10g/l de carbazole en suspension, 14 jours après ensemencement.

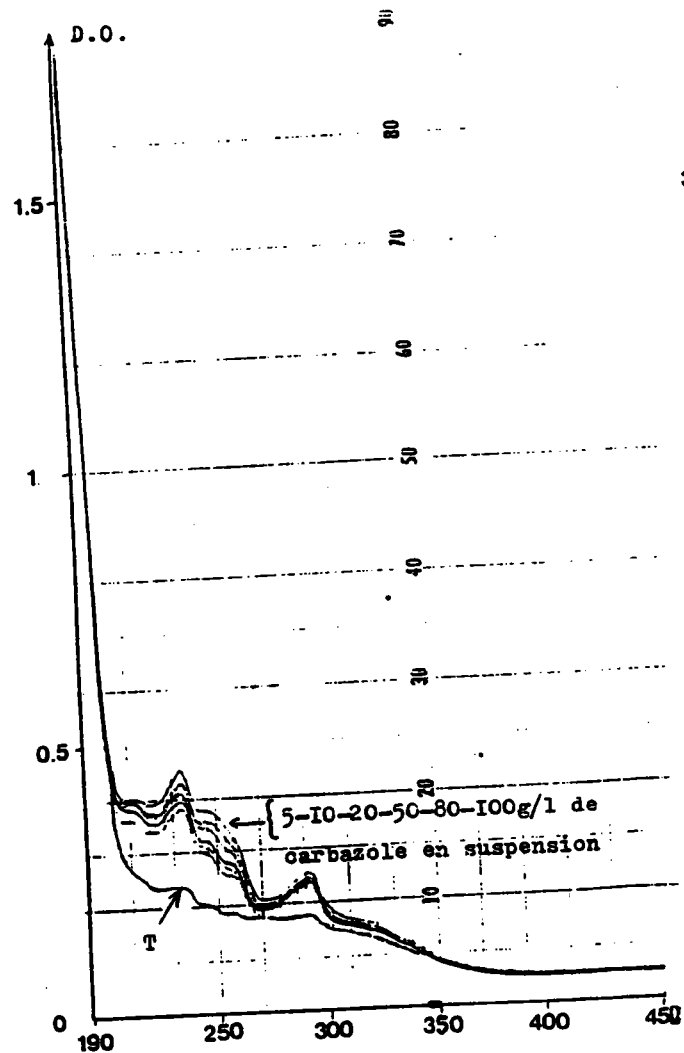


Figure I40 : Spectre U.V. des cultures ayant 0(témoin T)-5-10-20-50-80 et 100g/l de carbazole en suspension, deux jours après ensemencement.

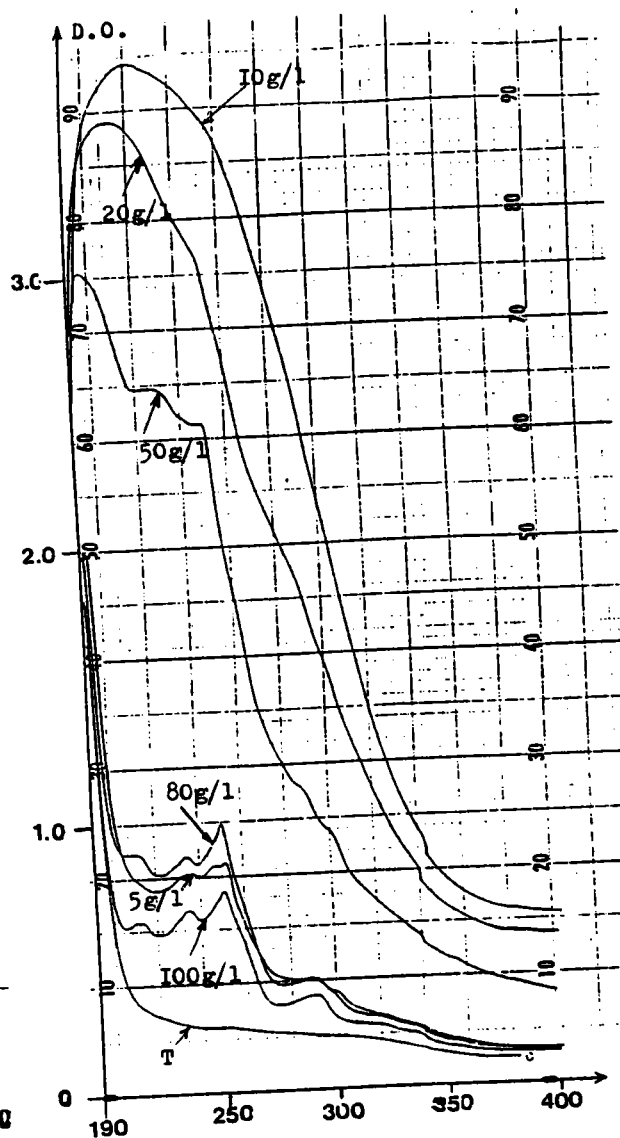


Figure I41 : Spectre U.V. des cultures ayant 0(témoin T)-5-10-20-50-80 et 100g/l de carbazole en suspension, 7 jours après leur ensemencement.

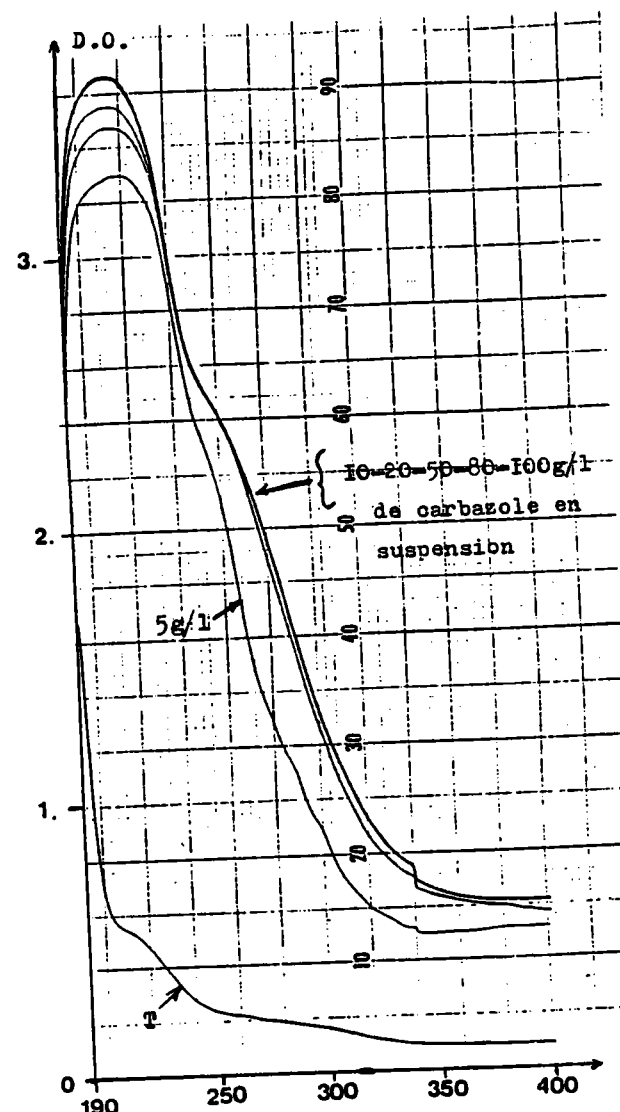


Figure I42 : Spectre U.V. des cultures ayant 0(témoin T)-5-10-20-50-80 et 100g/l de carbazole en suspension, 14 jours après leur ensemencement.

Les cultures à 10 g/l de carbazoleensemencées avec BA1 ou BA2 présentent l'évolution la plus rapide, et souvent la plus importante par rapport aux autres milieux. En suivant l'évolution, en fonction de l'âge de la culture, de la densité optique à la longueur d'onde de 254 nm caractéristique des noyaux aromatiques, la figure 143 montre que la densité optique à 254 nm augmente jusqu'au septième jour de culture pour ensuite se stabiliser ou diminuer selon la culture mixte utilisée (respectivement BA1 et BA2).

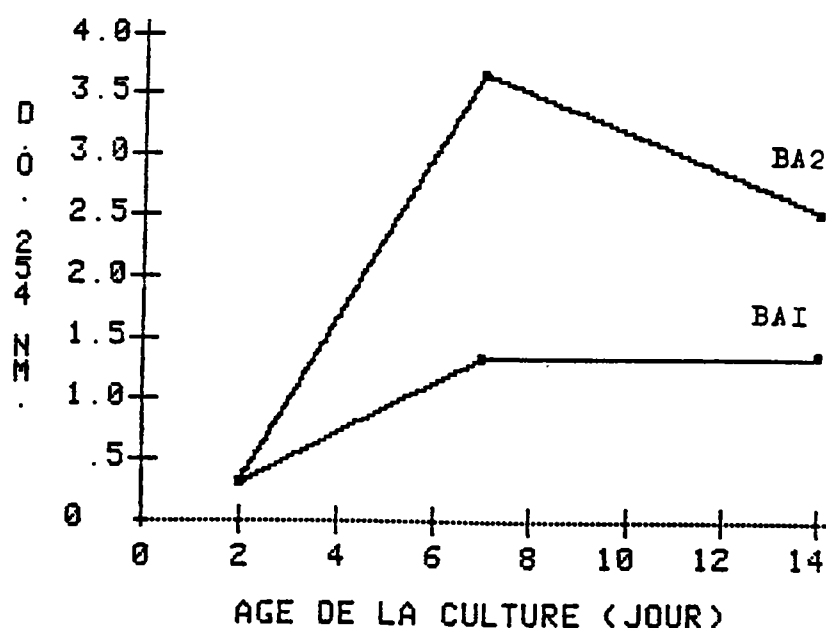


Figure 143 : Evolution de la densité optique à 254 nm en fonction de l'âge des deux cultures à 10 g/l de carbazole ensemencées respectivement avec les cultures mixtes de BA1 et de BA2.

La diminution de densité optique observée sur les cultures ensemencées avec la culture mixte provenant de la boue activée BA2 indique que la composition des milieux de culture a évolué. Ainsi, il semble que les milieux de quatorze jours contiennent moins de structures aromatiques que ceux de sept jours.

Le changement de composition du milieu est confirmé par la présence dans les milieux de quatorze jours, d'un composé soluble noirâtre absent dans les cultures âgées de sept jours. Les bactéries ont donc excrété d'autres molécules dans le milieu de culture.

En définitive, cette étude montre que les bactéries excrètent, dans les milieux de cultures, différentes molécules qui absorbent en U.V. et qui correspondent à des produits de dégradation du carbazole.

Aussi dans la culture mixte, les activités métaboliques de dégradation du carbazole par les souches pures *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* s'additionnent.

b) Biodégradation du carbazole en présence de tensioactifs

Les mesures par chromatographie en phase gazeuse (CPG 2) de la concentration en carbazole dans deux milieux stériles de même composition, avec ou sans tensioactif, ont montré que la concentration en carbazole dissous, i.e. immédiatement biodisponible, est neuf fois plus importante en présence des tensioactifs P94 et P103 qu'en leur absence (Tableau 24).

Tableau 24 : Concentration en carbazole dissous.

Composition du milieu stérile	Tensioactif (ml/l)	Concentration de carbazole dissous (mg/l)
C/N/P = 100/5/1 Carbazole 10 g/l pH = 6,9	P94 = 2,5 P103 = 2,5	9,2 ± 1,5
C/N/P = 100/5/1 Carbazole 10 g/l pH = 6,9	P94 = 0 P103 = 0	1,0 ± 0,2

Le carbazole qui n'est pas dissous dans l'eau est

- . soit en suspension
- . soit adsorbé sur les microorganismes.

L'étude de l'évolution du carbazole dissous a été menée sur trois milieux de culture supplémentés en tensioactifs (C/N/P. = 100/5/1, 10 g/l de carbazole) ensemencés respectivement avec *Agrobacterium sp. 2* (Figure 144), *Corynebacterium sp. 3* (Figure 145) et leur culture mixte (Figure 146).

Le carbazole a été mesuré par chromatographie en phase gazeuse (CPG 1) sur les extraits dichlorométhane (Figure 117) après filtration sur 0,22 µm pour éliminer les bactéries et le carbazole en suspension. Les mesures présentées sur les figures 144 à 146 ne permettent pas de mesurer le carbazole en suspension ou adsorbé. Les écarts-types présentés sur les figures 144 à 146 correspondent aux écarts-types liés à la mesure chromatographique.

En comparant les trois figures, il apparaît que la concentration en carbazole dissous évolue similairement quel que soit le microorganisme testé. La concentration diminue les premiers jours, augmente jusqu'au quatrième jour, pour ensuite diminuer.

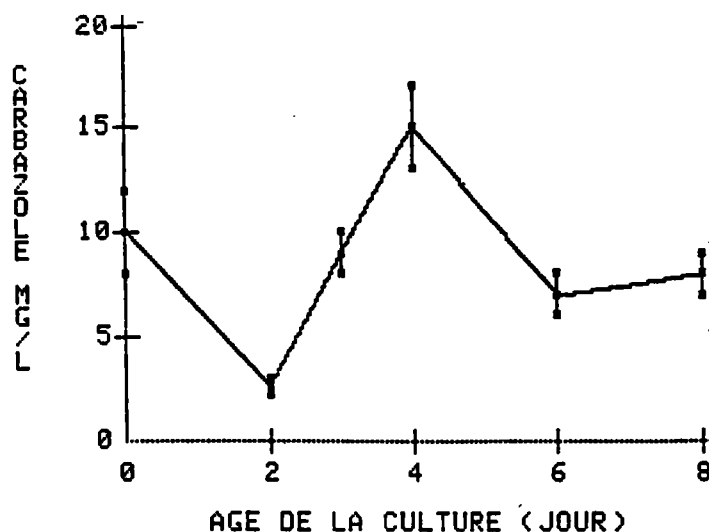


Figure 144 : Evolution de la concentration en carbazole dissous en fonction de l'âge de la cultureensemencée avec *Agrobacterium sp. 2* (culture n° 9).

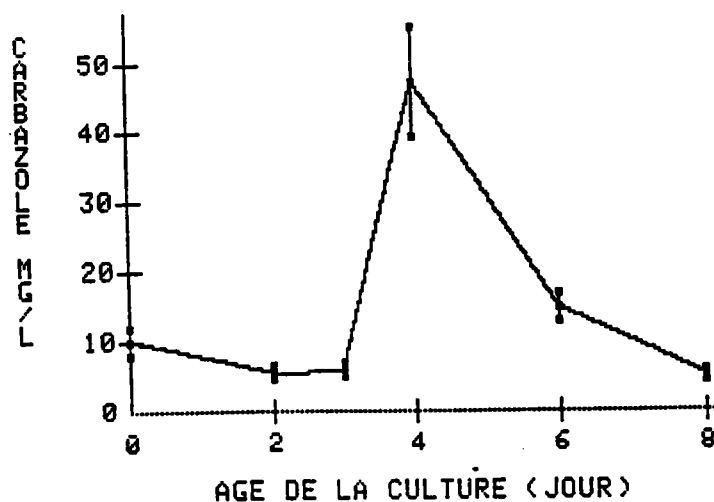


Figure 145 : Evolution de la concentration en carbazole dissous en fonction de l'âge de la cultureensemencée avec *Corynebacterium sp. 3* (culture n° 10).

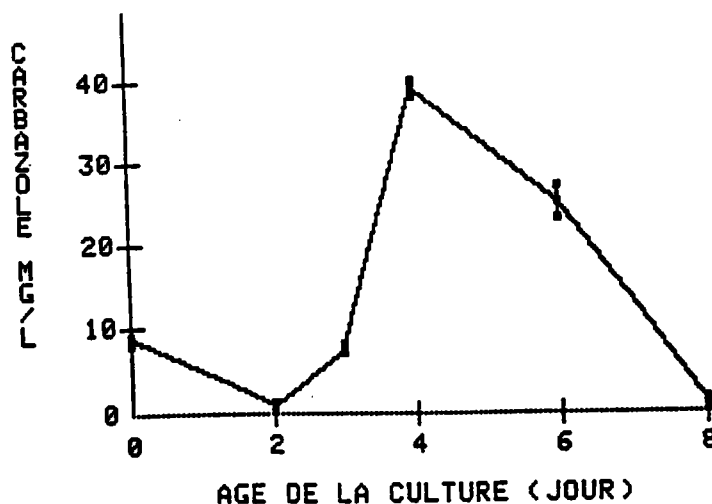


Figure 146 : Evolution de la concentration en carbazole dissous en fonction de l'âge de la cultureensemencée avec la culture mixte *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* (culture n° 11).

Les courbes présentées sur les trois figures correspondent à la résultante de deux phénomènes antagonistes :

- Dissolution du carbazole
- Biodégradation du carbazole dissous,

et ne correspondent pas à la valeur de la solubilité du carbazole dans le milieu de culture à l'instant de la mesure.

Si les évolutions de la concentration en carbazole sont comparées à celles de la croissance bactérienne des mêmes cultures (Figures 130, 131, 132), il s'avère que la concentration en carbazole reste faible pendant la phase de croissance exponentielle des bactéries, est la plus élevée pendant la phase de ralentissement de la croissance bactérienne, puis diminue lorsque les bactéries ont atteint leur phase plateau.

Il semble que le carbazole puisse être biodégradé par les bactéries lorsqu'elles sont en phase de croissance exponentielle et en phase plateau. Cette même observation a été faite lors de l'étude de la dégradation de l'acide carbazole monosulfonique par *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas* sp. 5 (Tableau 27).

L'ensemble des mesures montre que la biodisponibilité du carbazole est plus importante dans les milieux de culture avec les tensioactifs P94 et P103 ; cependant, un effet synergique est observé puisque la concentration en carbazole dissous peut atteindre 50 mg/l, alors qu'elle ne dépasse pas 10 mg/l dans des milieux stériles avec tensioactifs. Mesures effectuées sur 15 échantillons de même composition prélevés à des jours différents dans des conditions de température de $20 \pm 3^\circ\text{C}$, parallèlement aux échantillons prélevés dans les milieux de culture étudiés. Ces variations de solubilité ne peuvent être liées à un effet de température ($20 \pm 3^\circ\text{C}$), les témoins n'ayant jamais permis d'observer de telles variations (jusqu'à 50 mg/l).

Cette augmentation de concentration est probablement due aux bactéries testées qui possèdent un pouvoir de solubilisation des hydrocarbures (biotensioactif, paroi hydrophobe...) (cf. chapitre 2.7.1.).

Ces mesures montrent, une fois encore, que le carbazole est utilisé comme source de carbone par les bactéries.

La quantité de carbazole dégradée par les souches pures *Agrobacterium* sp. 2, *Corynebacterium* sp. 3 et leur culture mixte (cultures n° 9, 10 et 11 du tableau 19), pour les cultures réalisées dans les milieux ayant un rapport C/N/P = 100/5/1 à la concentration de 10 g/l de carbazole, a été mesurée et calculée par différence après avoir mesuré la quantité de carbazole dans le témoin de même composition (culture n° 8) et dans les cinq échantillons de 1 litre de chacune des cultures étudiées.

La masse de carbazole insoluble Q SI, obtenue par le traitement décrit dans le chapitre 3.7.8.1., est mesurée sur la phase SI et la masse de carbazole soluble Q LII sec sur la phase LII sec. La somme des mesures obtenues dans les deux phases et sur les cinq échantillons de 1 litre donne la masse totale de carbazole non biodégradable Q ND pour chaque culture.

$$QND = \sum_1^5 QSI + \sum_1^5 QLII \text{ sec.}$$

Pour le témoin, la quantité de carbazole est :

$$QND \text{ Témoin} = QSI \text{ Témoin} + QLII \text{ sec Témoin.}$$

La quantité de carbazole dégradée dans la culture est :

$$QD = QND \text{ Témoin} - QND$$

$$QD = QSI \text{ Témoin} - \sum_1^5 QSI + QLII \text{ sec Témoin} - \sum_1^5 QLII \text{ sec.}$$

QND correspond à la somme des quantités de carbazole non dégradé des cinq échantillons prélevés dans chaque culture et non pas simplement à la quantité contenue dans le cinquième échantillon, parce que le milieu de culture n'est pas homogène à cause de la quantité de carbazole solide en suspension.

Malgré l'agitation imposée, il reste toujours plus de carbazole au fond du fermenteur ; de ce fait, dans le dernier échantillon prélevé, la quantité de carbazole en suspension est toujours beaucoup plus élevée que dans les autres échantillons.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 25 et les éléments ayant permis de les calculer dans l'Annexe 6.

Tableau 25 : Quantité de carbazole dégradé QD pour les culturesensemencées avec *Agrobacterium sp. 2*, *Corynebacterium sp. 3* ou avec leur culture mixte (cultures n° 8, 9, 10 et 11 du tableau).

Bactéries testées	QND Témoin (g) (n° 8)	$\sum_1^5 QSI$ (g)	$\sum_1^5 QLII \text{ sec}$ (g)	QD (g)
<i>Agrobacterium sp.2</i> (n° 9)	49,2 ± 0,8	48,0 ± 0,9	0,041 ± 0,007	1,2 ± 1,7
<i>Corynebacterium sp.3</i> (n° 10)	49,2 ± 0,8	47,7 ± 0,7	0,08 ± 0,01	1,5 ± 1,5
<i>Agrobacterium sp.2</i> <i>Corynebacterium sp.3</i> (n° 11)	49 ± 1	46 ± 1	0,072 ± 0,003	3 ± 2

Les écarts-types présentés dans le tableau 25 intègrent l'erreur de mesure chromatographique (CPG 1) et l'addition des erreurs de mesure sur les 5 échantillons de 1 litre.

Seuls les résultats obtenus avec la culture mixte montrent avec certitude que le carbazole a bien été utilisé comme source de carbone.

Les pourcentages de carbazole dégradé par rapport à la quantité initiale ajoutée sont les suivants :

Agrobacterium sp. 2 2,4%

Corynebacterium sp. 3 3,0%

Agrobacterium sp. 2

+ 6,0%

Corynebacterium sp. 3

c) Substrat acide carbazole monosulfonique

La dégradation de l'acide carbazole monosulfonique par les souches pures *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* a été étudiée pour les cultures réalisées dans les milieux ayant un rapport C/N/P = 100/20/4 et 100/20/0,1 à la concentration de 5 g/l de substrat (cultures 12, 13, 14 et 15 ; Tableau 19).

Les évolutions des concentrations en acide carbazole monosulfonique sont représentées respectivement sur les figures 147 et 149 et celles des concentrations en hétérocycles par les figures 148 et 150.

La comparaison des résultats obtenus pour chacune des cultures indique que les deux techniques de dosage (HPLC chapitre 3.7.9.3 et la méthode au Xanthidrol chapitre 3.7.5) donnent des résultats similaires, prouvant ainsi que l'évolution des concentrations en hétérocycles suit celle des concentrations en acide carbazole monosulfonique.

Ces deux techniques ont donc une fiabilité similaire et peuvent ainsi être utilisées l'une comme l'autre pour étudier l'évolution des milieux de culture.

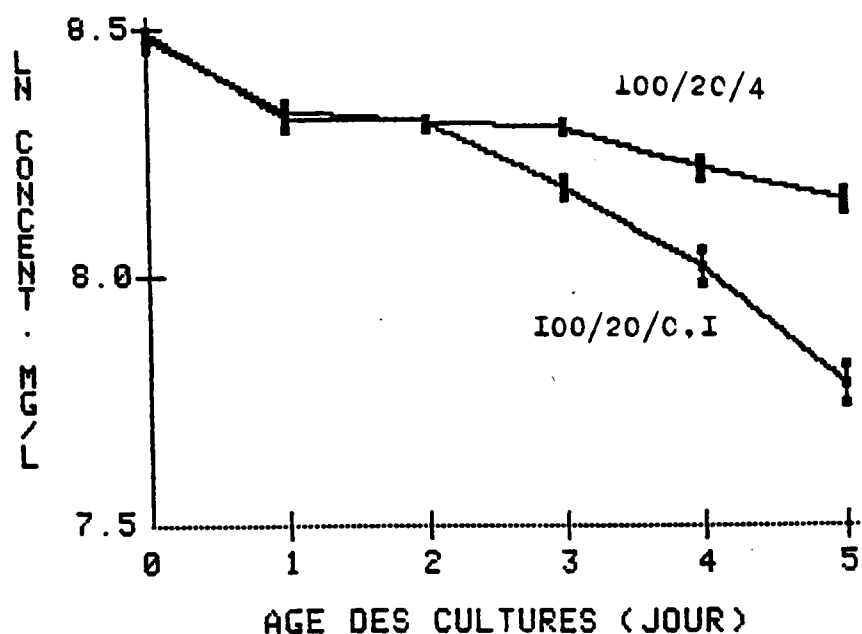


Figure 147 : Evolution du logarithme de concentration en acide carbazole monosulfonique en fonction de l'âge des cultures ensemencées avec *Proteus vulgaris*.

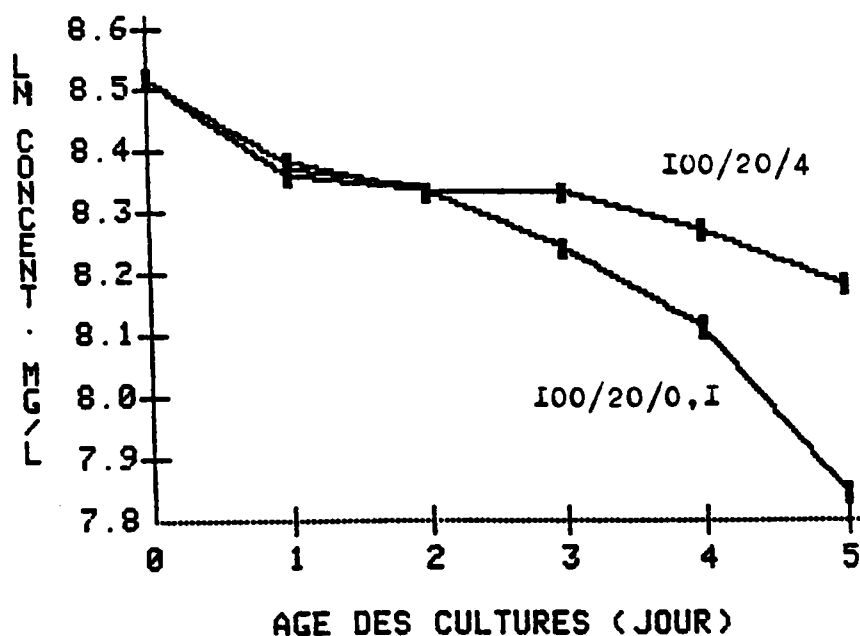


Figure 148 : Evolution du logarithme de la concentration en hétérocycles en fonction de l'âge des cultures ensemencées avec *Proteus vulgaris*.

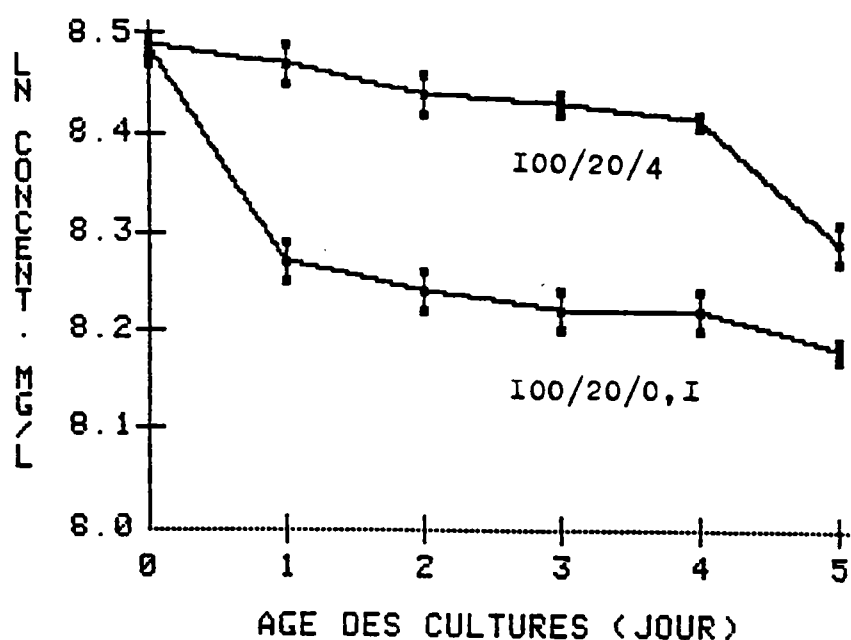


Figure 149 : Evolution du logarithme de la concentration en acide carbazole monosulfonique en fonction de l'âge des culturesensemencées avec *Pseudomonas sp. 5*.

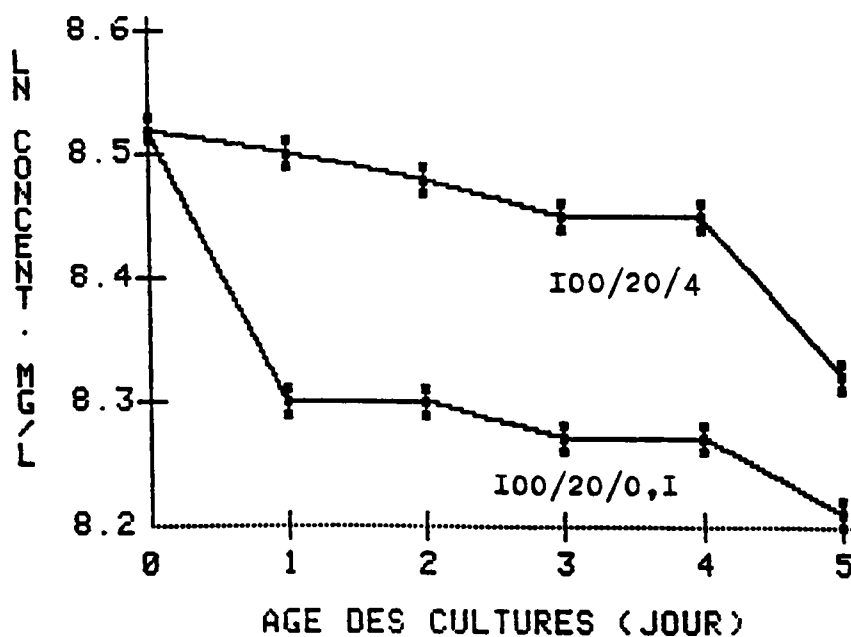


Figure 150 : Evolution du logarithme de la concentration en hétérocycles en fonction de l'âge des culturesensemencées avec *Pseudomonas sp. 5*.

En ce qui concerne la biodégradation du substrat, quelle que soit la bactérie, il apparaît qu'au bout de cinq jours de culture, le substrat acide carbazole monosulfonique est consommé en plus grande quantité dans les milieux C/N/P = 100/20/0,1 que dans les milieux C/N/P. = 100/20/4 ensemencés avec les mêmes bactéries (Tableau 26).

Tableau 26 : Pourcentage d'acide carbazole monosulfonique consommé par *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* dans les différents milieux étudiés.

Bactéries testées	Milieu	Milieu
	C/N/P = 100/20/4	C/N/P = 100/20/0,1
<i>Proteus vulgaris</i>	28 ± 2%	50 ± 3%
<i>Pseudomonas sp. 5</i>	17 ± 3%	26 ± 3%

Il semble que les milieux carencés en phosphore (C/N/P = 100/20/0,1) permettent une meilleure dégradation du substrat carboné. Cependant, comme cela a été montré auparavant sur les figures 144 et 145, ces mêmes milieux sont moins favorables à la croissance bactérienne que les milieux C/N/P = 100/20/4.

Aussi l'acide carbazole monosulfonique, en milieu carencé en phosphore, est utilisé par les bactéries pour se multiplier, pour produire du CO₂, mais aussi pour relarguer des produits solubles qui nous intéressent.

Toutefois, comme les graphes le montrent, une certaine partie du substrat est dégradée avant d'observer la croissance bactérienne et une autre pendant la phase plateau de la population bactérienne.

Le tableau 27 rapporte les quantités de substrat consommées avant et après la croissance exponentielle des bactéries *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* dans les différents milieux de culture. Il apparaît que les pourcentages d'acide carbazole monosulfonique consommés avant croissance des bactéries sont beaucoup plus élevés dans les conditions de milieu de culture carencé en phosphore (C/N/P = 100/20/0,1) que dans les conditions de carence en carbone (C/N/P = 100/20/4). Les milieux carencés en phosphore nous intéressent au plus haut point car ils montrent qu'un important pourcentage du substrat est dégradé pour la maintenance des bactéries, ce qui doit permettre la production de CO₂ et le relargage de métabolites dans le milieu de culture. Il est, de ce fait, très probable que ce soit dans ce type de milieu de culture que nous ayons le plus de chance de rencontrer des molécules de structure indolique.

Tableau 27 : Evolution des pourcentages d'acide carbazole monosulfonique consommé avant et après la croissance bactérienne des bactéries.

Microorganismes biodégradeurs	C/N/P	% d'acide carbazole monosulfonique consommé avant croissance des bactéries	% d'acide carbazole monosulfonique consommé après croissance exponentielle
<i>Proteus vulgaris</i>	100/20/4	18 ± 2	10 ± 2
<i>Proteus vulgaris</i>	100/20/0,1	37 ± 3	ND
<i>Pseudomonas sp.5</i>	100/20/4	5 ± 3	5 ± 3
<i>Pseudomonas sp.5</i>	100/20/0,1	23 ± 3	ND

ND : Non déterminé.

5.3.3. EVOLUTION DU PH

La pHmétrie est une technique simple et fiable qui permet de mesurer de façon sensible l'acidité ou la basicité de toutes sortes de milieux aqueux. C'est pourquoi, cette technique a été utilisée pour mettre en évidence des variations de composition des milieux de culture, variations qui seront significatives d'une activité biochimique.

Ces analyses ont été effectuées sur des milieux de culture de compositions différentes,ensemencés avec des cultures pures ou mixtes et avec comme substrat le carbazole ou son dérivé sulfoné.

Ce chapitre est présenté en deux parties, chacune d'elles étant fonction du substrat utilisé : le carbazole et l'acide carbazole monosulfonique.

a) Substrat carbazole

Les mesures de pH ont été effectuées sur treize milieux de culture (Tableau 20) dont les quantités ajoutées en substrat carbazole varient entre 0 et 100 g/l.

Les évolutions des cultures ensemencées par les cultures mixtes des boues activées BA1 et BA2 sont respectivement représentées par les figures 151 et 152.

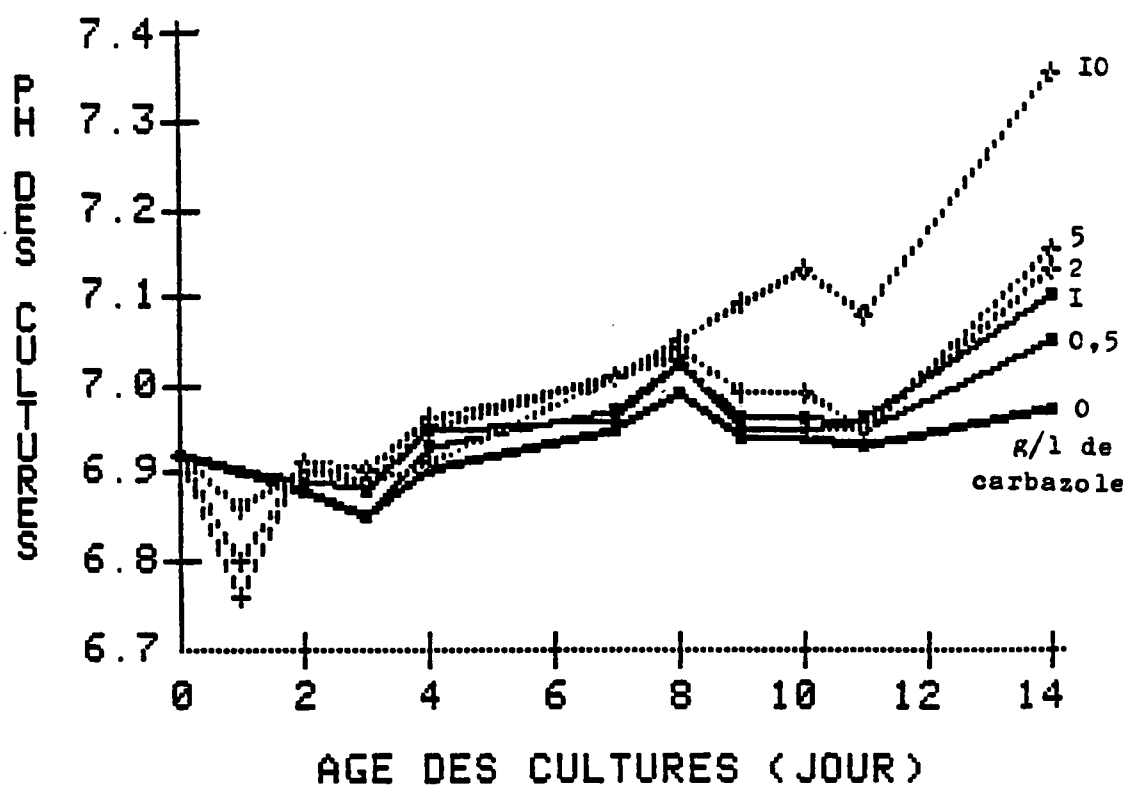


Figure 151 : Evolution du pH des cultures (n° 17 à 22) ensemencées avec BA1.

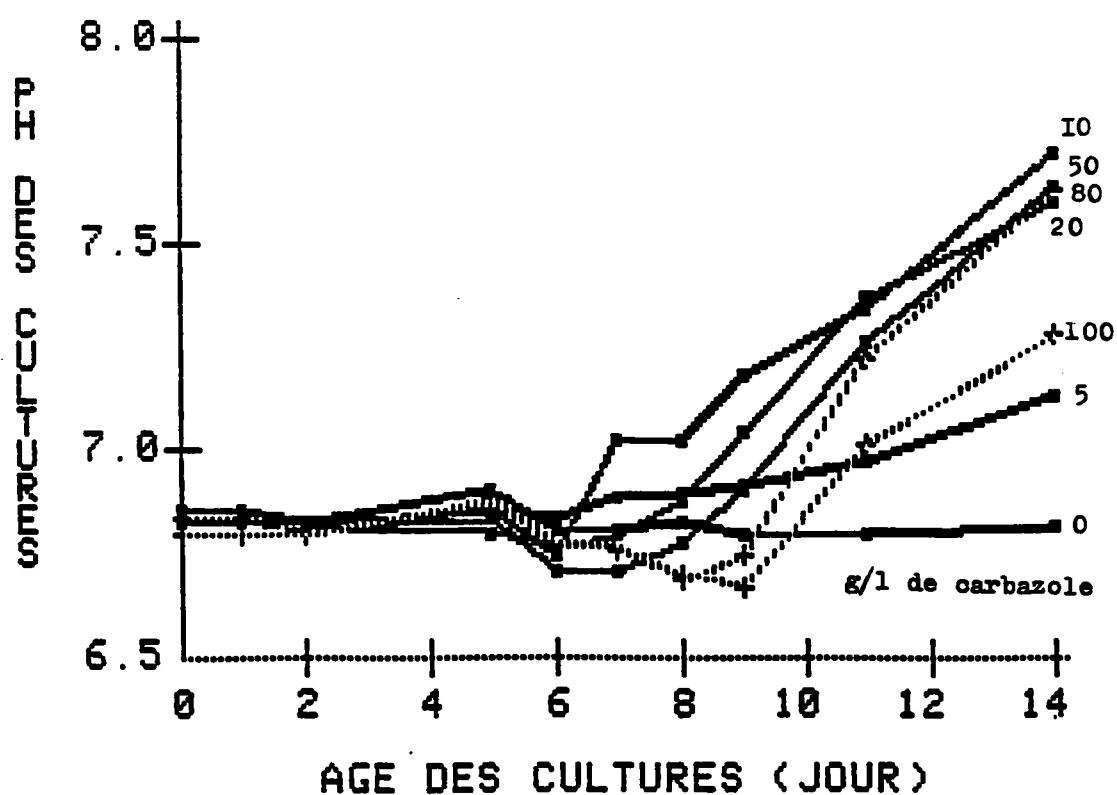


Figure 152 : Evolution du pH des cultures (n° 23 à 29) ensemencées avec BA2.

Les deux figures montrent que l'évolution du pH d'une culture ayant le carbazole comme substrat peut se présenter en quatre parties :

- La première partie (observable uniquement sur la figure 151) se caractérise par une chute du pH pouvant atteindre 0,15 unités, 24 heures après ensemencement. Cette variation n'a été observée que sur les plus fortes concentrations de carbazole en suspension (2 - 5 et 10 g/l) ensemencées avec la culture mixte de la boue activée BA1 et semble indiquer que le carbazole puisse être biodégradé avant croissance bactérienne. En tout cas, cette variation du pH semble rapidement compensée puisque, dès le deuxième jour, les cultures retrouvent des valeurs similaires aux pH initiaux.

- La deuxième partie se caractérise par une évolution du pH des cultures qui est similaire à celle des témoins (0 g/l de carbazole) et ceci jusqu'au

- . dixième jour pour les cultures ayant 0,5 à 5 g/l de carbazole en suspension (Figure 151)
- . huitième jour pour les cultures ayant 10 g/l de carbazole en suspension (Figure 151)
- . sixième jour pour les cultures ayant 5 à 100 g/l de carbazole en suspension (Figure 152).

Cette période sans variation du pH peut être considérée comme correspondant à une phase de latence pour les microorganismes ou encore à une phase d'adaptation.

- La troisième partie se caractérise par une légère diminution du pH par rapport aux témoins. Cette diminution est surtout apparente pour les cultures ayant une concentration en carbazole en suspension supérieure ou égale à 10 g/l (cultures n° 22, 25, 26, 27, 28 et 29).

Plus la suspension en carbazole est importante, plus cette variation tarde. C'est pourquoi, comme le montre la figure 152, un décalage dans les variations de pH permet de caractériser chaque culture.

- La quatrième partie se caractérise par une augmentation du pH du onzième jour au quatorzième jour. Le fait que tous les pH soient supérieurs à celui du témoin au quatorzième jour traduit une activité bactérienne dépendante de la concentration en carbazole ajouté dans les milieux de culture, comme le montre la figure 153 rapportant les valeurs du pH des différentes cultures après quatorze jours d'incubation.

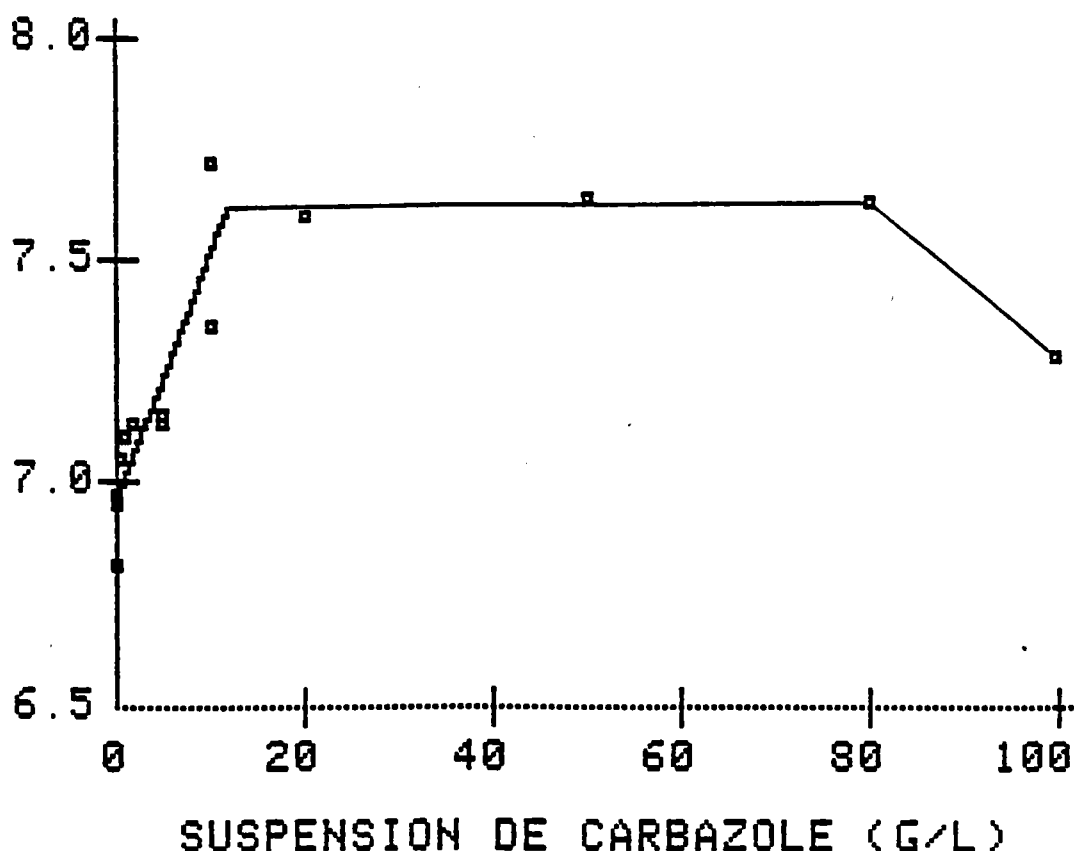


Figure 153 : Evolution du pH en fonction de différentes quantités de carbazole ajoutées dans des cultures incubées pendant quatorze jours.

Au quatorzième jour d'incubation, le pH augmente de façon linéaire en fonction de la quantité de carbazole mise en suspension selon l'équation :

$$Y (\text{pH}) = 0,055 X [\text{carbazole g/l}] + 6,95$$

$r = 0,8734$ significatif à 0,01 pour $n = 9$

et ceci jusqu'à la concentration de 10 g/l. L'ajustement au modèle $Y = AX + B$ a été accepté avec un risque d'erreur de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{th} = 12,25$; $F_{calc} = 22,52$) et du T de Student ($T_{th} = 3,50$; $T_{calc} = 4,74$).

De plus, l'observation montre que les valeurs de pH au quatorzième jour sont semblables entre 20 et 80 g/l de carbazole et diminuent pour des concentrations supérieures.

Les variations de pH sont donc les plus importantes pour les milieux contenant plus de 10 g/l de carbazole (pH initiaux = $6,87 \pm 0,05$), et ce jusqu'à 80 g/l.

La culture à 10 g/l de carbazole (C/N/P = 100/5/1) correspond au milieu de culture dans lequel la production de métabolites alcalins est la plus élevée par rapport à la quantité initiale de carbazole mise en suspension.

L'étude des produits de dégradation sera effectuée, de ce fait, sur des cultures ayant les mêmes caractéristiques de composition (rapports C/N/P = 100/5/1 pour une suspension de carbazole à 10 g/l).

Parallèlement à ces mesures de pH, ont été effectuées des mesures d'absorbance à 620 nm et, comme le pH, ce paramètre évolue comme une fonction de la quantité de carbazole en suspension, et ceci quatorze jours après l'ensemencement (Figure 154).

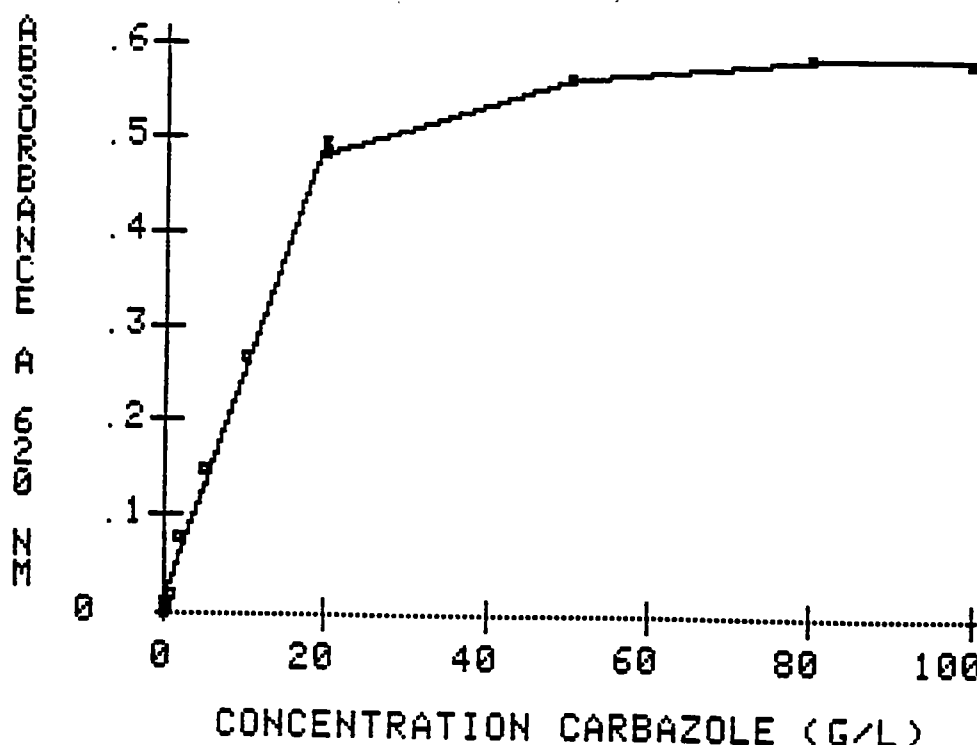


Figure 154 : Evolution de l'absorbance à 620 nm en fonction de différentes quantités de carbazole ajoutées, dans les cultures de 14 jours.

La mesure d'absorbance à 620 nm exprime principalement la turbidité du milieu et traduit ainsi le développement d'une population bactérienne.

Après quatorze jours d'incubation des différents milieux testés, l'absorbance augmente de façon linéaire en fonction de la quantité de carbazole mise en suspension selon l'équation :

$$Y \text{ (Absorbance à 620 nm)} = 0,0243 X [\text{carbazole g/l}] + 0,008$$

$r = 0,995$ significatif à 0,01 pour $n = 7$

et ceci jusqu'à la concentration de 20 g/l. L'ajustement au modèle $Y = AX + B$ a été accepté avec un risque d'erreur de 0,01 par le test du F de Snedecor ($F_{th} = 16,26$; $F_{calc} = 538,5$) et par le test du T de Student ($T_{th} = 4,032$; $T_{calc} = 23,20$).

Pour des concentrations de carbazole supérieures à 20g/l les valeurs d'absorbance se stabilisent entre 0,5 et 0,6 unité de densité optique, soit parce qu'il y a carence d'un des produits nutritifs (azote ou phosphore), soit parce que la concentration élevée en carbazole produit un effet toxique sur les bactéries.

Par rapport aux mesures de pH, les conclusions sont relativement semblables. Il semble que les conditions de croissance bactérienne et d'activité métabolique soient optimales pour les suspensions de carbazole comprises entre 10 et 20 g/l.

b) Substrat carbazole + tensioactifs

Si l'ajout des tensioactifs P94 et P103 ne permet pas d'observer une évolution du pH des cultures, différente de celle déjà observée dans les cultures ayant le carbazole comme substrat (Figures 151 et 152), trois phénomènes nouveaux sont cependant mis en évidence :

- Le premier représenté par la figure 155 montre que, quelles que soient les quantités initiales de carbazole mises en suspension, les évolutions des pH sont semblables dans les cultures ensemencées par une culture mixte.

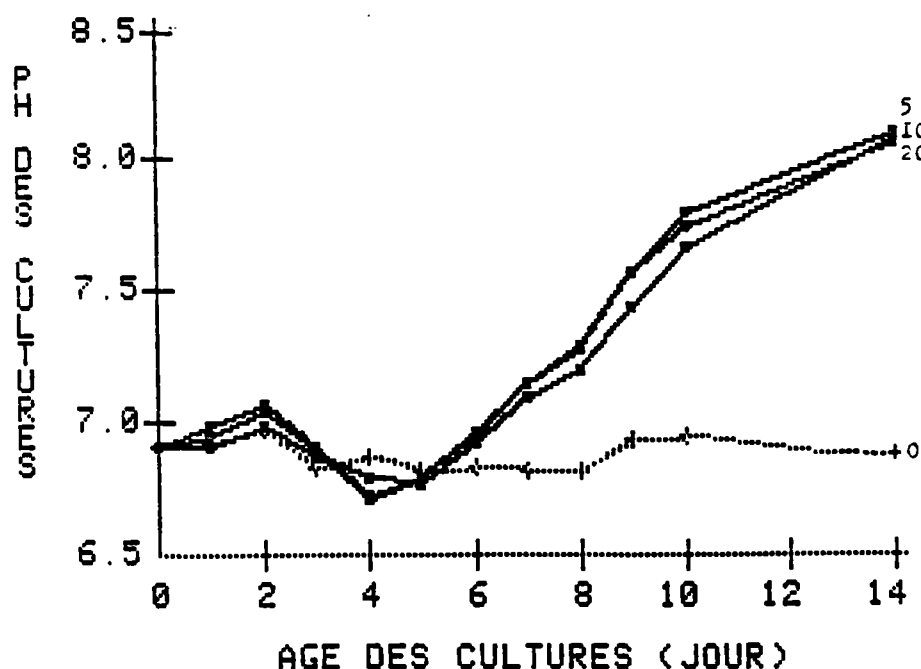


Figure 155 : Evolution du pH en fonction de l'âge des cultures, ayant une suspension de 5, 10, 20 g/l de carbazole (cultures n° 38, 39, 40 ; Tableau 21), ensemencées avec la culture mixte obtenue à partir de BA1 (C/N/P = 100/5/1).

- Le deuxième montre que l'évolution du pH en fonction de l'âge des cultures, évolue de la même façon quelle que soit la culture mixte (BA1 ou BA2) utilisée (Figure 156).

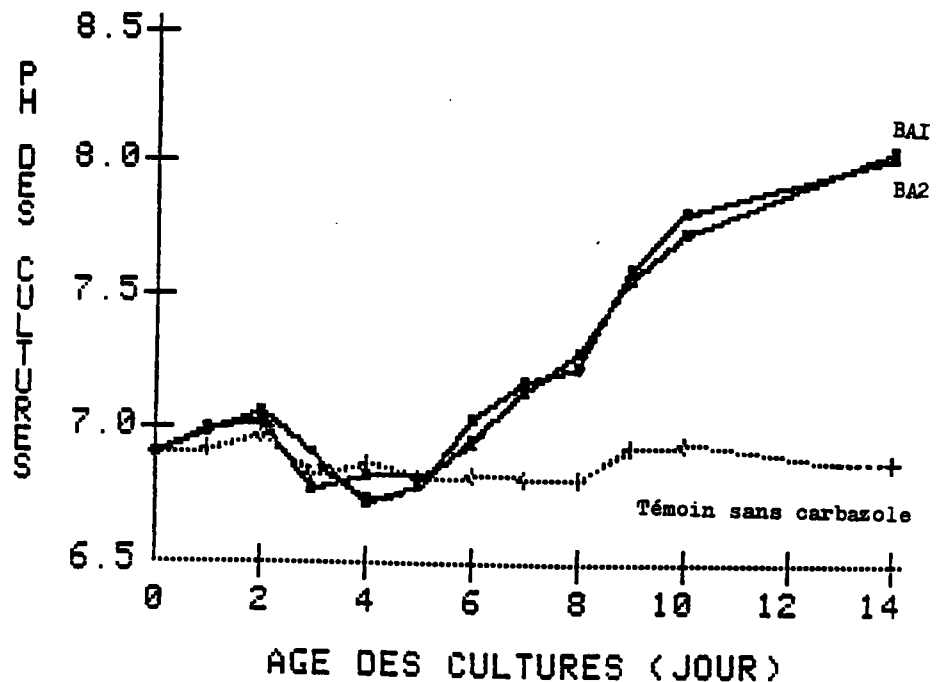


Figure 156 : Evolution du pH en fonction de l'âge des cultures ayant une suspension de 10 g/l de carbazole (cultures n° 39 et 42 ; Tableau 21)ensemencées avec BA1 et BA2 (C/N/P = 100/5/1).

- Le troisième représenté par la figure 157, montre que la phase de latence pendant laquelle le pH de la culture ne varie pas, est plus courte (d'au moins trois jours dans le cas des suspensions de carbazole à 10 g/l) dans les cultures avec tensioactifs.

Le pH de la culture avec tensioactifs évolue de la même façon que la culture sans tensioactifs, tout en conservant le décalage initial observé sur les phases de latence.

Les trois témoins sans carbazole mais avec tensioactifs (cultures n° 31, 32, 33 ; Tableau 21) évoluent de la même façon que le témoin sans substrat et sans tensioactif (culture n° 30 ; Tableau 21).

Cette observation montre que les tensioactifs P94 et P103 n'influent pas directement sur l'évolution du pH. L'évolution du pH des autres cultures est due uniquement à la dégradation du carbazole ; de ce fait, le décalage observé dans les cultures avec tensioactifs, par rapport aux cultures sans tensioactif, indique que l'activité métabolique de dégradation du carbazole est plus rapide en présence des tensioactifs P94 et P103.

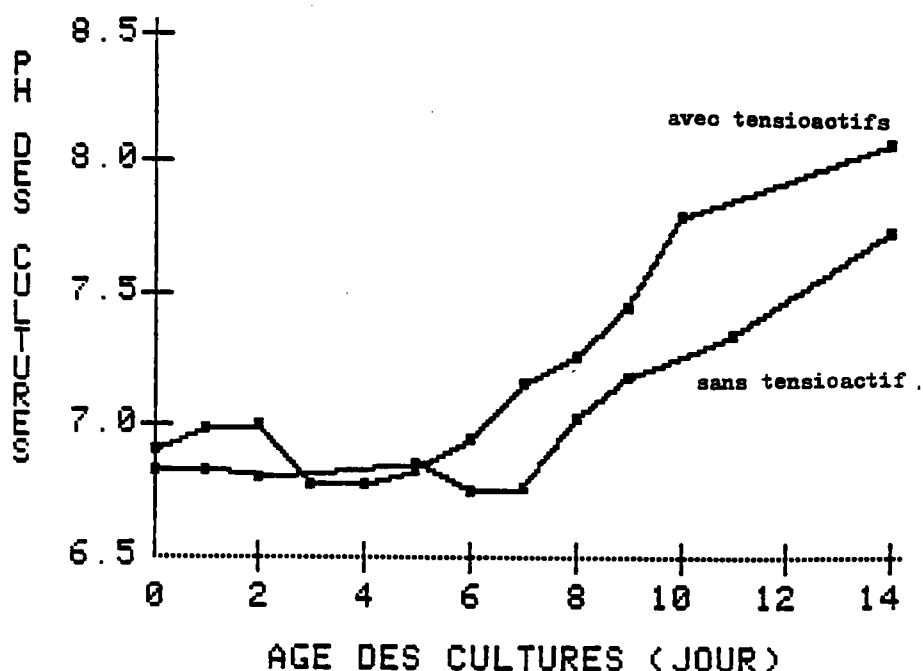


Figure 157 : Evolution du pH en fonction de l'âge des cultures n° 25 (Tableau 20) et 39 (Tableau 21) ayant pour substrat le carbazole (10 g/l) et ensemencées avec BA2 (C/N/P = 100/5/1).

Toutes ces observations montrent que le système tensioactifs + carbazole conserve ses propriétés (cinétique de solubilisation du carbazole) durant les quatorze jours de culture, puisque

- la solubilisation du carbazole n'est jamais totale (un dépôt de carbazole au fond des cultures est toujours observable),
- l'évolution du pH reste identique quelles que soient les quantités initiales de carbazole et quels que soient les microorganismes utilisés.

De plus, le but de l'utilisation des tensioactifs de synthèse semble atteint, puisque les évolutions de pH montrent que la dégradation du carbazole est plus rapide en présence des tensioactifs.

En fait, il semble que le type d'évolution présenté sur les figures 155 et 156 soit caractéristique de la dégradation du carbazole par une culture mixte. En effet, si ce schéma est effectivement observé lors de la dégradation du carbazole par la culture mixte *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* (culture n° 11) (Figure 158), il n'est pas retrouvé lors de l'étude de leur culture pure (Figures 159 et 160) (cultures n° 9 et 10).

Pour *Agrobacterium sp. 2* (Figure 159), après une légère diminution du pH le premier jour, celui-ci augmente les jours suivants pour évoluer en dents de scie.

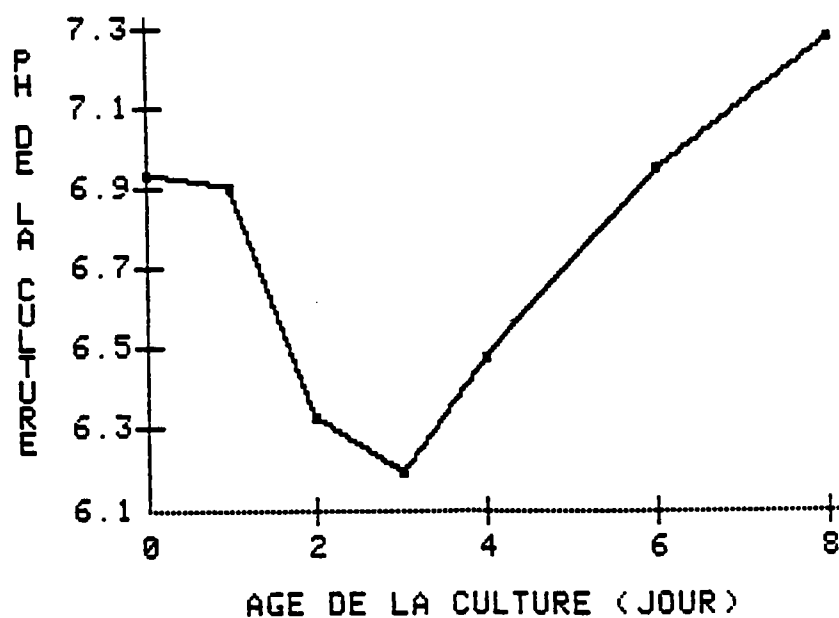


Figure 158 : Evolution du pH de la culture ensemencée avec la culture mixte *Agrobacterium* sp. 2 et *Corynebacterium* sp. 3 (C/N/P = 100/5/1 ; 10 g/l de carbazole en suspension).

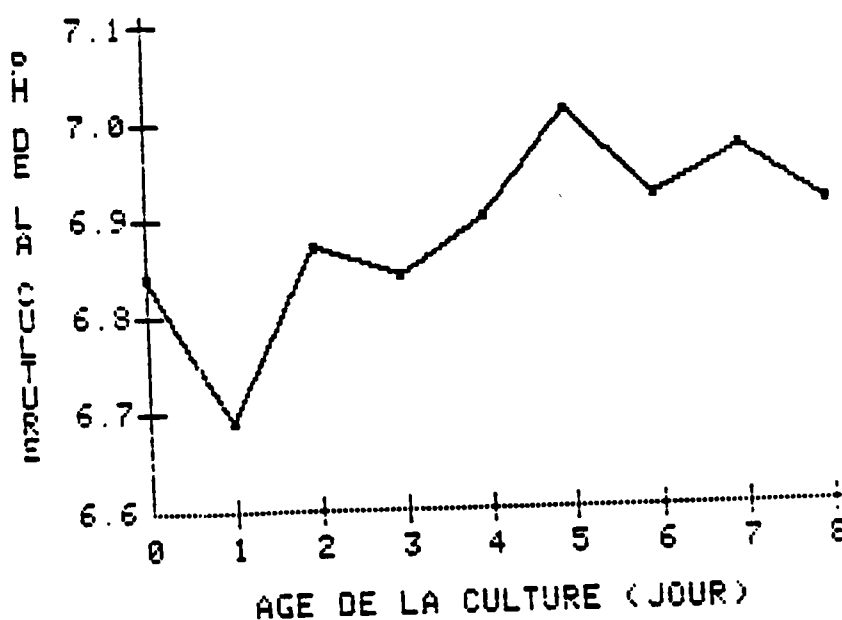


Figure 159 : Evolution du pH de la culture ensemencée avec la culture pure *Agrobacterium* sp. 2 (C/N/P = 100/5/1 ; 10 g/l de carbazole en suspension).

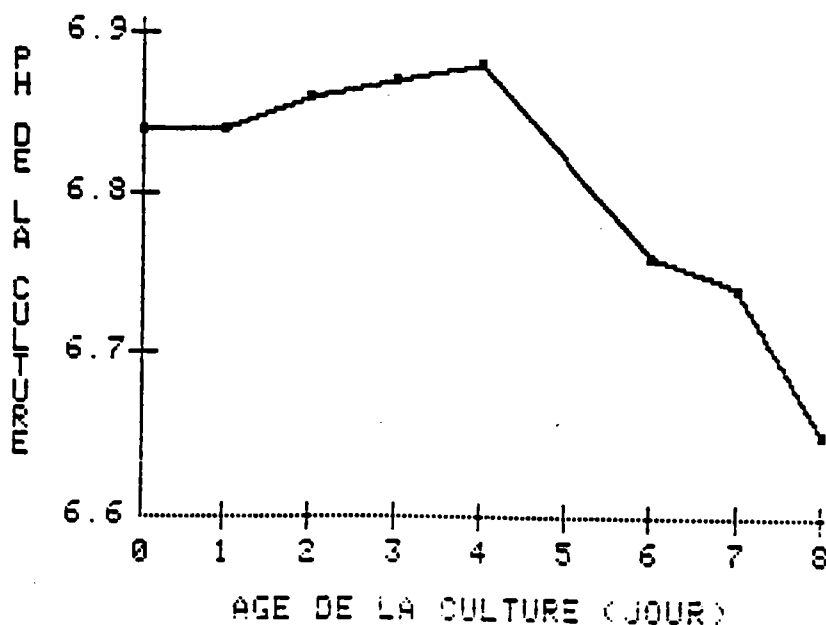


Figure 160 : Evolution du pH de la culture ensemencée avec la culture pure *Corynebacterium sp. 3* (C/N/P = 100/5/1 ; 10 g/l de carbazole en suspension).

Pour la culture *Corynebacterium sp. 3*, après une légère augmentation du pH jusqu'au quatrième jour, le pH diminue de 0,2 unité jusqu'au huitième jour (Figure 160).

Ces mesures montrent que la dégradation du carbazole avec une culture mixte ne permet pas une production de métabolites extracellulaires similaire à celle obtenue avec une culture bactérienne pure.

c) Substrat acide carbazole monosulfonique

Les variations de pH des cultures ayant l'acide carbazole monosulfonique ont été étudiées sur des milieux de rapport C/N/P = 100/20/4, de pH initial 6,2 et ensemencés par les souches pure *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5*.

La concentration en acide carbazole monosulfonique est de 5 g/l dans chaque culture et s'avère non toxique pour les bactéries (Figures 133 et 134).

Les variations de pH des deux cultures sont représentées respectivement sur les figures 161 et 162.

Le pH de la culture ensemencée avec *Proteus vulgaris* (Figure 161) diminue pendant les trois premiers jours pour ensuite se stabiliser. Par contre, avec la culture ensemencée avec *Pseudomonas sp. 5*, le pH évolue de manière tout à fait opposée. En effet, après avoir été stable pendant les trois premiers jours de culture, il diminue par la suite.

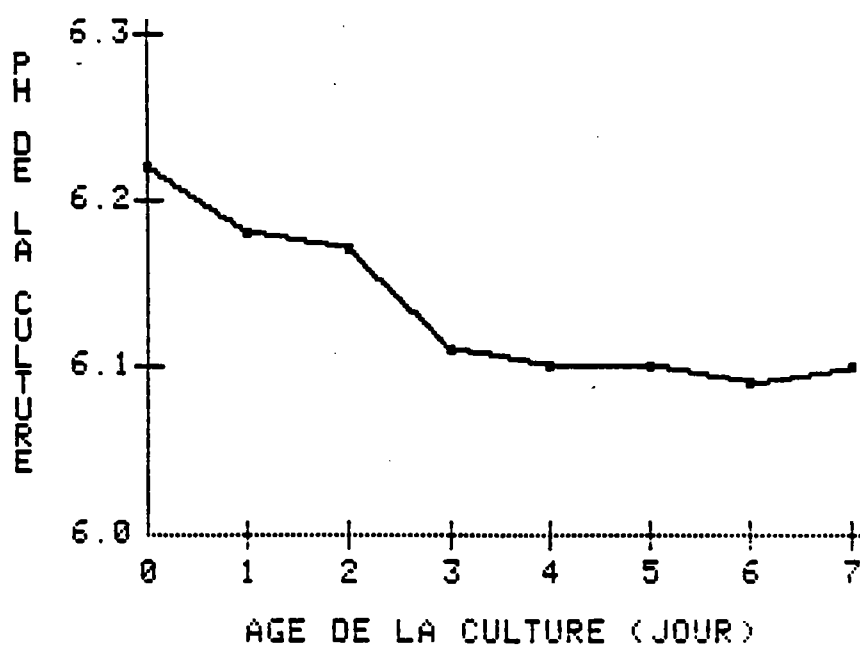


Figure 161 : Evolution du pH en fonction de l'âge de la culture (n° 6 ; Tableau 19) ensemencée avec *Proteus vulgaris*.

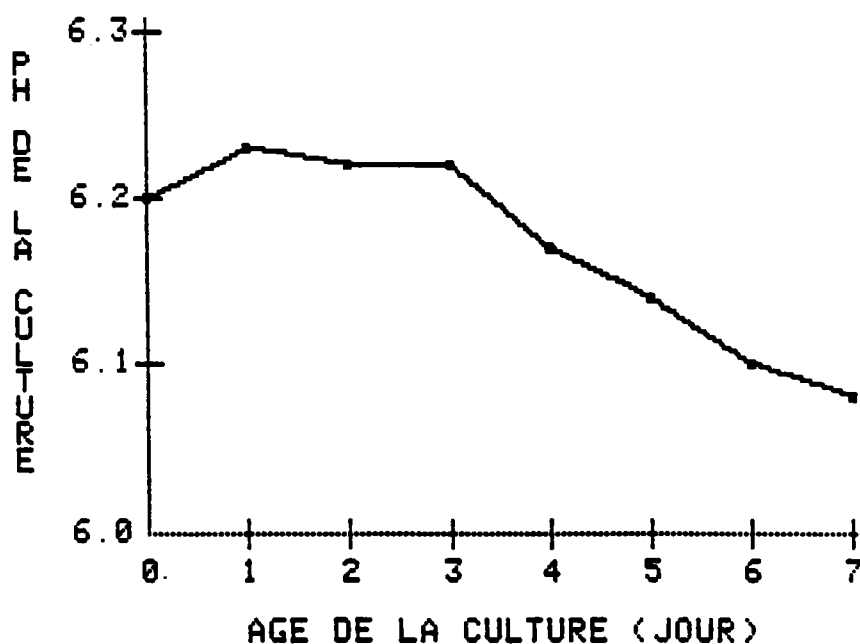


Figure 162 : Evolution du pH en fonction de l'âge de la culture (n° 7 ; Tableau 19) ensemencée avec *Pseudomonas sp. 5*.

Dans les milieux de culture ayant pour substrat l'acide carbazole monosulfonique, le pH tend à diminuer en fonction de l'âge des cultures et ceci quels que soient les microorganismes testés.

La diminution de pH peut être due, comme le prévoit la bibliographie (cf. 2.7.3.3.), à la libération dans le milieu de culture des groupements $-SO_3^-$, sous forme sulfonate ou sulfate lors de la dégradation de l'acide carbazole monosulfonique, au relargage de protons par les bactéries lors de leur activité métabolique, ou bien encore à la production de métabolites polaires dans le milieu de culture.

La diminution du pH est caractéristique de l'activité bactérienne.

5.4. DISCUSSION

5.4.1. OPTIMISATION DES MILIEUX DE CULTURE

Ce chapitre a permis de montrer que les cultures ayant comme substrat le carbazole ou l'acide carbazole monosulfonique sont sensibles à l'action des différents facteurs nutritifs et physico-chimiques.

C'est ainsi que quatre paramètres ont été étudiés pour optimiser la croissance des bactéries avec le substrat acide carbazole polysulfonique :

- la quantité ajoutée en substrat
- la concentration en azote
- la concentration en phosphore
- le pH initial.

Quant aux autres paramètres intervenant dans la croissance bactérienne comme les concentrations en calcium, magnésium et sulfate, ils ont été initialement contrôlés. Seule la concentration en oxygène dissous ne l'a pas été.

Le choix des concentrations en carbone, azote et phosphore demeure le paramètre le plus important dans l'étude des cultures. En effet, les activités métaboliques des bactéries peuvent varier en fonction des concentrations de ces trois éléments fondamentaux et, de ce fait, l'optimisation des conditions de culture doit permettre une production maximale ou minimale de biomasse, ou une dégradation maximale du substrat carboné, ou une production maximale de métabolites, ou encore leur combinaison.

Il faut, de ce fait, s'attendre à ce que certaines conditions de rapport C/N/P favorisent la croissance bactérienne, tandis que des rapports différents favorisent l'augmentation de la dégradation du substrat ou la production de métabolites.

Par exemple, les taux de conversion en biomasse Y_x , en gaz carbonique Y_{CO_2} et en produits extracellulaires Y_p évoluent selon la nature du substrat limitant (Carbone ou Azote ou Phosphore) lors de la dégradation du glucose par *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 (Neijssel & Tempest, 1975) (Tableau 28).

Tableau 28 : Evolution de la consommation en glucose par *Klebsiella aerogenes* et variations des différents taux de conversion (Neijssel & Tempest, 1975).

Substrat limitant	Glucose consommé milli-atomes de C/h	Y_x	Y_{CO_2}	Y_p
Carbone C	36,8	54,3	42,4	0
Azote N	107,4	18,6	18,8	63
Phosphore P	112,8	17,7	18,1	61,2

Du tableau 28 ressortent les trois observations suivantes :

1) Environ trois fois moins de glucose est dégradé dans le milieu carbone limitant par rapport aux milieux azote et phosphore limitant.

2) La production des produits extracellulaires est nulle dans les milieux carencés en carbone. La totalité du substrat carboné est utilisée par les bactéries pour leur croissance ou éliminée sous forme de CO_2 . Ce type de milieu n'est pas favorable à la production de métabolites.

3) Les quantités supplémentaires de glucose dégradé, dans les milieux azote et phosphore limitant, par rapport au milieu carbone limitant, sont presque totalement converties en produits extracellulaires. Les milieux azote et phosphore limitant favorisent donc la production de métabolites. Cependant, il apparaît que la concentration et la formulation de chacun des produits extracellulaires identifiés peuvent varier suivant le type de carence. *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 peut produire le pyruvate uniquement en milieu azote limitant et de l'acide gluconique uniquement en milieu carencé en phosphore.

Comme ces résultats le montrent, les concentrations en carbone, azote et phosphore sont les facteurs importants qui interviennent dans les voies de dégradation d'une source de carbone.

Aussi, lors de notre étude de la dégradation de l'acide carbazole sulfonique, la concentration en azote NH_4^+ a été choisie élevée, d'une part parce qu'elle favorise la croissance bactérienne et, d'autre part parce que, pour obtenir des molécules du type indole, il faut éviter à la bactérie d'utiliser l'atome d'azote du noyau carbazole comme par exemple a pu le montrer l'étude de la dégradation du dinitrophénol par *Pseudomonas sp.* N.26-8 (Bruhn *et al.*, 1987). Le milieu de culture ne doit donc pas être carencé en azote.

La concentration en azote étant fixée de par la formulation même du carbazole, le choix de la concentration en phosphore s'avère, de ce fait, plus complexe. En effet, un milieu phosphore limitant a été testé et a entraîné un ralentissement de la croissance bactérienne par rapport au milieu non carencé. De ce fait, le milieu phosphore limitant peut aboutir à une diminution de la cinétique de dégradation par rapport au milieu non carencé (Le Petit & N'Guyen, 1976 ; Atlas & Bartha, 1972).

Inversement, les travaux de Neijssel & Tempest (1975) ont permis d'observer une augmentation de la cinétique de dégradation et de la production de métabolites extracellulaires avec un milieu phosphore limitant.

C'est pourquoi, simultanément ont été testés les milieux phosphore limitant et phosphore non limitant. L'étude a ainsi montré que l'acide carbazole monosulfonique est dégradé en plus grande quantité dans les conditions de carence (C/N/P = 100/20/0,1).

Comme la croissance est plus lente dans les conditions de carence, il est probable que ces milieux produisent plus de métabolites extracellulaires comme le confirment les observations faites par Neijssel & Tempest (1975) avec *Klebsiella aerogenes* NCTC 418.

Quant au choix du pH initial de la culture, il doit être choisi judicieusement puisqu'il peut lui aussi favoriser la croissance bactérienne (Lennox & Kuchera, 1986) ou/et la dégradation de la source de carbone (Delaune *et al.*, 1981 ; Chapman & Cole, 1982 ; Larkin & Day, 1985).

Dans notre étude, il a été choisi de telle sorte qu'il favorise la croissance bactérienne.

Comme il avait été dit au début de ce chapitre, la concentration en oxygène dissous n'a pas été contrôlée bien qu'elle joue sans doute un rôle important dans la dégradation du carbazole. S'il est effectivement préférable que la dégradation d'un composé aromatique s'effectue en présence d'oxygène dissous afin de faciliter le clivage du cycle aromatique (cf. 2.3.), en l'absence d'oxygène moléculaire, le carbazole peut être dégradé si la bactérie est capable d'utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (capacité de dénitrification) (Bossert *et al.*, 1986). Sinon la bactérie ne peut qu'hydrogéner les cycles et leur faire perdre leur propriété d'aromaticité (Neilson *et al.*, 1985 ; Hutber & Ribbons, 1983).

En ce qui concerne les facteurs intervenant dans l'évolution des milieux de culture, la liste n'est pas exhaustive. Le dernier exemple cité sera la carence en sulfate dans les milieux de culture, qui présente l'intérêt de favoriser la production de métabolites extracellulaires (Neijssel & Tempest, 1975).

En définitive, dans l'étude de la dégradation de l'acide carbazole monosulfonique, les milieux qui sont les plus favorables à la production de métabolites extracellulaires correspondent à ceux qui sont carencés en phosphore (C/N/P = 100/20/0,1).

5.4.2. EVOLUTION DES CULTURES

Les résultats ayant montré que les cultures n'étaient pas statiques en fonction du temps (croissance, pH, biodégradation), ce chapitre se propose de discuter les différentes évolutions observées en fonction du type de substrat : le carbazole et les acides carbazole sulfoniques.

5.4.2.1. Substrat carbazole

Comme le chapitre 5.3.3. l'a montré, la dégradation du carbazole en présence des tensioactifs P94 et P103 est meilleure.

C'est pourquoi la discussion va s'effectuer sur les évolutions du pH, de la population et de la concentration en carbazole dissous correspondant aux tendances moyennes observées dans les milieux étudiés dans le chapitre 5.3. avec les cultures mixtes obtenues à partir des boues activées BA1 et BA2.

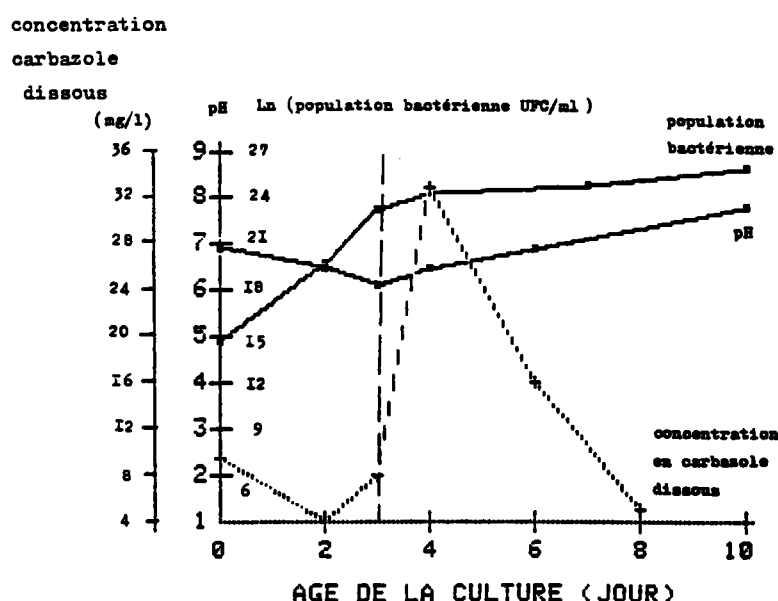


Figure 163 : Evolutions moyennes du pH, de la population bactérienne Ln (UFC/ml) et de la concentration en carbazole dissous (mg/l) obtenues à partir de différentes cultures ayant le carbazole comme substrat et contenant les tensioactifs P94 et P103.

Comme le montre la figure 163, l'évolution des différents paramètres étudiés change simultanément après trois jours de culture. En effet, quand les bactéries croissent de façon exponentielle, le pH diminue et la concentration en carbazole dissous dans le milieu de culture reste faible jusqu'au troisième jour. La phase de ralentissement de la croissance bactérienne se caractérise par une forte augmentation de la concentration en carbazole dissous et par un début d'augmentation du pH.

L'évolution du pH des cultures est, jusque-là, tout à fait semblable à celle du dextrose dégradé par une population mixte (Lennox & Kuchera, 1986).

La diminution du pH est due à la production de molécules extracellulaires par les bactéries (Rehm & Reiff, 1981 ; Lennox & Kuchera, 1986) et au rejet dans le milieu extérieur de protons, grâce au système complexe de la chaîne respiratoire de la bactérie, en générant ainsi de part et d'autre de la membrane un gradient indispensable au fonctionnement du système ATP synthétase (Gottschalk, 1985).

La phase plateau des bactéries se caractérise par une alcalinisation du milieu et par une diminution de la concentration du carbazole dissous semblant indiquer que le carbazole est biodégradé par les bactéries dans leur phase plateau.

L'alcalinisation du milieu n'a pas été observée lors de la dégradation du dextrose (Lennox & Kuchera, 1986), ce qui semble indiquer que ce phénomène est dû au substrat carbazole et tout particulièrement à son atome d'azote.

En effet, il peut y avoir production de métabolites basiques ou encore d'ammoniaque comme le laissent prévoir les travaux de Hegeman (1966) sur le tryptophane, de Aoki *et al.* (1983) sur l'aniline, de Latorre *et al.* (1984) sur les monochloroanilines, et de Sims *et al.* (1986) sur la pyridine.

5.4.2.2. Substrat acide carbazole monosulfonique

Comme pour le carbazole, la discussion va s'effectuer par rapport aux évolutions moyennes des différentes cultures ayant pour substrat l'acide carbazole monosulfonique et ensemencées avec *Proteus vulgaris*. Les tendances observées sont représentées sur la figure 164.

La figure 164 montre que, quand les bactéries croissent de façon exponentielle, la concentration en substrat diminue et le pH aussi.

Contrairement aux cultures de carbazole, le pH de ces milieux de culture ne devient pas alcalin, mais s'acidifie en fonction du temps.

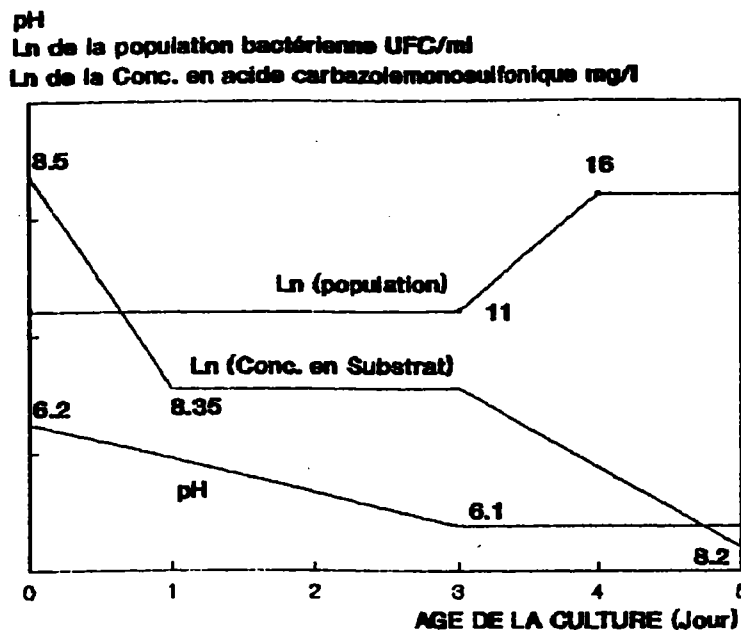


Figure 164 : Evolutions moyennes du pH, de la population bactérienne et de la concentration en acide carbazole monosulfonique obtenues à partir de différentes culturesensemencées avec *Proteus vulgaris*.

Cette observation semble normale puisque la désulfonation constitue un stade inévitable de la dégradation d'une molécule avec production de sulfite (SO_3^{2-} , HSO_3^-) ou/et de sulfate (Cain & Farr, 1968 ; Focht & Williams, 1970 ; Endo *et al.*, 1977) même si celle-ci apparaît après ouverture du cycle aromatique.

Les taux de conversion Y_x (exprimés en g d'organismes synthétisés/g de substrats consommés) sont élevés avec les cultures ayant l'acide monosulfonique comme substrat dans les conditions C/N/P = 100/20/4, ($Y_x = 90 \pm 30$) et comparables avec les valeurs obtenues par Tempest & Neijssel (1978) dans les cultures carencées en glucose ($Y_x = 81$) ou en mannitol ($Y_x = 91$) etensemencées avec *Klebsiella aerogenes* NCTC 418.

Cette étude comparative permet d'affirmer que dans ces conditions de culture (C/N/P = 100/20/4), les milieux sont substrat limitant.

Comme l'indiquent les travaux de Neijssel & Tempest (1975), il est alors possible que ces milieux de culture ne soient pas favorables à la production de métabolites extracellulaires.

5.4.3. INTERET DES TENSIOACTIFS P94 ET P103

Les tensioactifs P94 et P103 utilisés dans l'étude de la dégradation du carbazole présentent les avantages suivants :

1) Ils montrent que les tensioactifs ne sont pas toxiques pour certaines bactéries capables d'utiliser le carbazole comme source de carbone.

2) Ils augmentent la biodisponibilité du carbazole pour les bactéries en augmentant sa solubilité dans l'eau et favorisent sa dégradation. En effet, la dégradation d'un hydrocarbure ne peut s'accomplir qu'une fois solubilisé dans l'eau. Ces observations sont en accord avec les travaux de Mulkins-Phillips & Stewart (1974) qui ont observé une meilleure dégradation du pétrole brut en utilisant les tensioactifs Corexit 8666, Gamlen Sea Clean, GH Woods Degreaser Formula 11470 et Sugee 11.

3) L'équilibre tensioactifs + carbazole semble conserver ses propriétés pendant au moins quatorze jours de culture. Cette observation n'empêche pas la dégradation des deux tensioactifs par les bactéries comme le chapitre 6.3.2.2. le montrera. Ceci n'est d'ailleurs pas étonnant puisque, à de rares exceptions près, les tensioactifs de synthèse sont biodégradables même si leur cinétique de dégradation est lente (Mulkins-Phillips & Stewart, 1974 ; Liu, 1983 ; Una & Garcia, 1983 ; Kikuchi, 1985). Malgré tout, les tensioactifs seront utilisés lors de la dégradation du carbazole, que cela soit avec des cultures mixtes ou bien pures, puisque leur ajout dans les milieux favorise la biodégradation de l'hydrocarbure.

6. METABOLITES ISSUS DE LA BIODEGRADATION DU CARBAZOLE

6.1. OBJECTIFS

Ce chapitre est présenté en deux parties :

* La première partie vise à montrer la présence de molécules solubles dans les milieux de culture et produites par les microorganismes testés à partir du carbazole utilisé comme substrat.

* La seconde partie de ce chapitre correspond à l'analyse qualitative et quantitative des échantillons contenant des produits de dégradation et permet :

- d'étudier certains métabolites extracellulaires,
- de montrer la présence ou l'absence de structures indoliques,
- de relier les paramètres nature du milieu et des souches bactériennes testés à la production de composés indoliques.

6.2. PROTOCOLE

Les analyses des métabolites produits ont été effectuées sur quatre milieux de cultures, ayant un volume de cinq litres préparés dans des fermenteurs de six litres fermés et stérilisés, dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau 29.

Tableau 29 : Composition des milieux de culture et origine des microorganismes testés.

Numérotation des cultures	Substrat	Concentration du substrat g/l	Tensioactifs	C/N/P	pH	Bactéries
8	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,87	-
9	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,84	<i>Agrobacterium sp.2</i>
10	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,83	<i>Corynebacterium sp.3</i>
11	carbazole	10	2,5 ml/l P94 2,5 ml/l P103	100/5/1	6,93	<i>Corynebacterium sp.3</i> <i>Agrobacterium sp.2</i>

L'agitation des milieux est maintenue à l'aide d'un moteur BIOLAFITTE, leur oxygénation est effectuée par bullage à l'aide d'un compresseur, et les prélèvements sont effectués à l'aide d'une pompe Bioblock Scientific Masterflex.

Le milieu estensemencé avec 200 ml de souches pures (*Agrobacterium* ou *Corynebacterium*), seules ou en mélanges, provenant d'une préculture dont le milieu était de composition

identique. Cette préculture, âgée de sept jours, est centrifugée à 4000 tours par minute pendant vingt minutes, après élimination du carbazole par décantation. Le culot bactérien est repris dans de l'eau distillée stérile, puis ajouté dans le fermenteur pour conférer à l'ensemble un volume de cinq litres.

Cinq prélèvements de 1 litre sont effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture et chaque échantillon est traité suivant la méthode présentée dans le chapitre 3.7.8.1. L'aspect quantitatif des échantillons est effectué en pesant de manière précise (balance Mettler H51) le lyophilisat et les phases LIIsec, LIIIsec et SIII (cf. 3.7.8.1.). L'aspect qualitatif est effectué en analysant par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (cf. 3.7.9.4.) les échantillons LIIsec et LIIIsec.

6.3. RESULTATS

6.3.1. ANALYSES QUANTITATIVES DES ECHANTILLONS

Une fois prélevés et filtrés afin d'éliminer le carbazole non dissous et les bactéries, les échantillons sont lyophilisés. Les masses des différents lyophilisats sont rassemblées dans le tableau 30.

Globalement, comme le montre le tableau 30, les masses des lyophilisats n'évoluent guère en fonction du temps et restent du même ordre de grandeur, quelle que soit la culture étudiée. Il en est de même pour les lyophilisats du témoin dont les masses évoluent peu : $11,8 \pm 0,1$ g/l d'échantillon.

Les lyophilisats sont séparés en trois phases (phase dichlorométhane LIIsec, phase diméthylformamide LIIIsec et phase insoluble SIII (cf. 3.7.8.1.).

Les figures 165, 166 et 167 représentent les masses des différentes phases des cinq lyophilisats obtenus 2 jours, 3 jours, 4 jours, 6 jours et 8 jours après l'ensemencement respectivement de la culture *Agrobacterium sp. 2*, *Corynebacterium sp. 3* et de la culture mixte. Ces résultats peuvent être comparés sur les mêmes figures avec les valeurs moyennes obtenues avec les échantillons obtenus après traitement du témoin sans bactérie (culture n° 8).

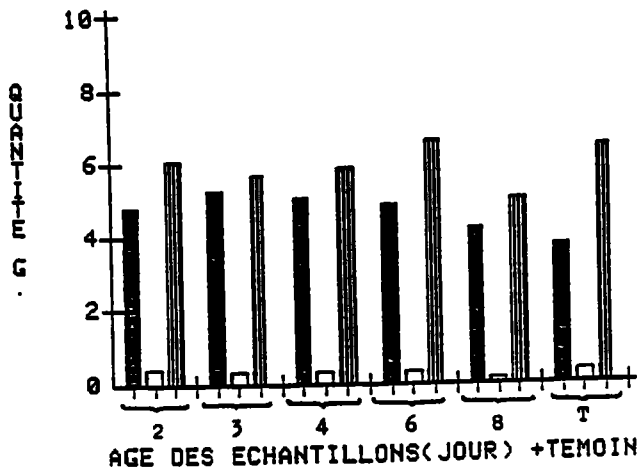


Figure 165 : Histogramme représentant l'évolution des trois phases LIIsec, LIIIsec et SIII en fonction de l'âge de la cultureensemencée avec *Agrobacterium* sp.2. Comparaison avec son témoin T.

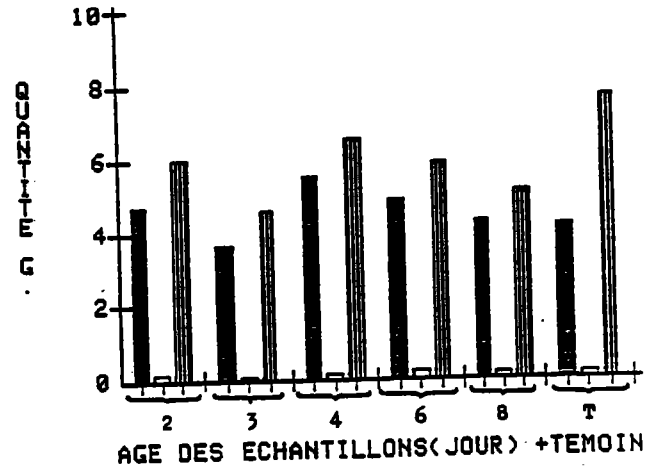


Figure 166 : Histogramme représentant l'évolution des trois phases LIIsec, LIIIsec et SIII en fonction de l'âge de la cultureensemencée avec *Corynebacterium* sp.3. Comparaison avec son témoin T.

Phase dichlorométhane
sèche LIIsec

Phase diméthylformamide
sèche LIIIsec

Phase résiduelle sèche
SIII

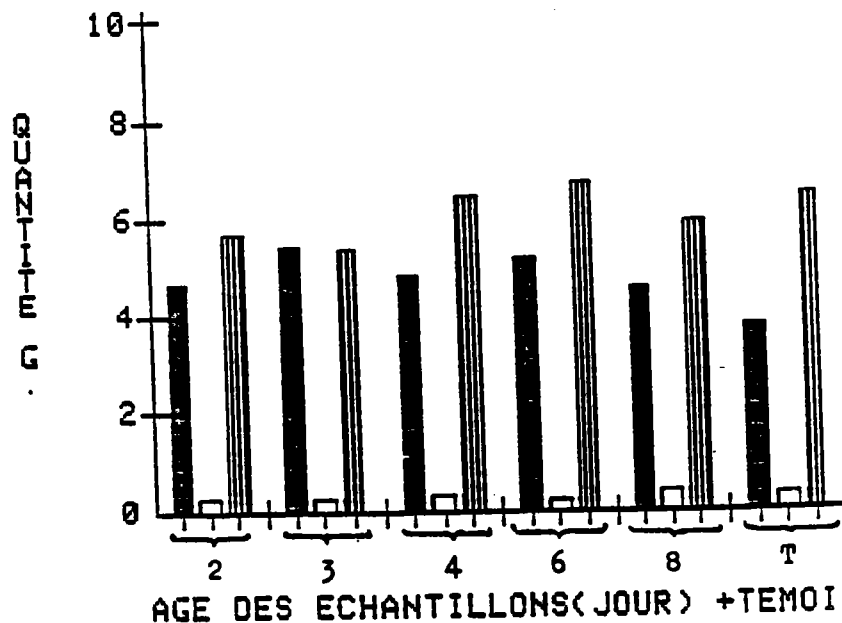


Figure 1167 : Histogramme représentant l'évolution des trois phases LIIsec, LIIIsec et SIII en fonction de l'âge de la cultureensemencée avec *Agrobacterium* sp. 2 et *Corynebacterium* sp. 3. Comparaison avec son témoin T.

Tableau 30 : Masse des lyophilisats des cinq échantillons de chacune des cultures étudiées (cultures n° 9, 10 et 11).

Age du prélèvement après ensemencement de la culture (j)	Poids des lyophilisats (g)			
	Témoin sans bactéries	<i>Agrobacterium sp.2</i> (culture n° 9)	<i>Corynebacterium sp.3</i> (culture n° 10)	Culture mixte (culture n° 11)
2	11,7	10,72	13,58	10,84
3	11,7	14,33	12,98	8,32
4	11,9	12,16	13,50	12,20
6	11,9	12,49	13,33	10,86
8	11,9	13,02	8,55	9,44
Moyenne des cinq échantillons	11,8 ± 0,1	13 ± 1	12 ± 2	10 ± 2

Ces différents résultats sont comparés avec ceux obtenus avec le témoin T traité de la même façon.

D'une manière générale, quelle que soit la culture étudiée, la phase des sels minéraux SIII est la plus importante ($\geq 50\%$ du poids total des lyophilisats). La phase dichlorométhane est aussi importante (42 à 48%) mais reste inférieure à SIII. Quant à la phase DMF LIIIsec, elle reste faible et dépasse rarement 2% de la masse totale du lyophilisat.

Les résultats présentés dans les trois figures ne permettent pas de montrer une évolution en fonction de l'âge de la culture. Par contre, leur comparaison avec le témoin T est intéressante :

- les masses des phases SIII des cinq échantillons prélevés dans le témoin entre deux et huit jours sont toujours supérieures à celles des cultures ensemencées avec *Agrobacterium sp. 2*, *Corynebacterium sp. 3* et leur culture mixte. Cette observation montre que les bactéries consomment des sels minéraux (en particulier les phosphates) pour leur croissance ;

- les masses des phases dichlorométhane LIsec des cinq échantillons prélevés dans le témoin sont toujours inférieures à celles des cultures ensemencées. Cette observation peut signifier que :

- 1° des produits excrétés par les bactéries sont solubles dans le dichlorométhane,

- 2° les microorganismes ont une activité blotensioactive et favorisent la solubilisation de certaines molécules organiques. Ce phénomène avait d'ailleurs déjà été observé dans le chapitre précédent, où avait été observée une augmentation de la solubilité du carbazole (jusqu'à 50 mg/l) dans le milieu de culture qui ne pouvait pas être uniquement due aux deux tensioactifs de synthèse P94 et P103.

La phase LIIIsec reste faible ; la production de composés polaires semble donc être peu importante à moins que ceux-ci ne soient solubles dans le dichlorométhane.

6.3.2. ANALYSES QUALITATIVES DES ECHANTILLONS

Les analyses sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée avec un spectromètre de masse (cf. 3.7.9.4.), sur les phases dichlorométhane LIIsec et diméthylformamide LIIIsec des cinq échantillons prélevés entre deux et huit jours des cultures ensemencées respectivement avec *Agrobacterium sp. 2*, *Corynebacterium sp. 3* et leur culture mixte (cultures n° 9, 10 et 11). Les mêmes analyses sont effectuées sur leur témoin (culture n° 8).

Toutefois, de l'ensemble des résultats on peut souligner dès maintenant les observations suivantes :

- aucune molécule de structure indolique n'a été retrouvée,
- de nombreux fragments de tensioactifs ont été identifiés,
- de nombreuses molécules correspondant à du matériel cellulaire ont été mises en évidence,
- des impuretés du carbazole ont été retrouvées et certains de leurs produits de dégradation ont été observés,
- quelques molécules de faible taille pouvant correspondre à des produits de dégradation du carbazole semblent avoir été identifiées.

Les détails des résultats sont présentés dans les paragraphes suivants.

a) Les phases dichlorométhane

Tous les chromatogrammes sont rassemblés en Annexe 8 (Figures 209 à 226).

Les figures 209, 210a, 210b, 211a, 211b, 212 et 213 représentent les chromatogrammes des phases obtenues 2 jours, 3 jours, 4 jours, 6 jours et 8 jours après ensemencement avec *Agrobacterium sp. 2*.

Les figures 214, 215, 216, 217 et 218 représentent les chromatogrammes des phases obtenues après ensemencement avec *Corynebacterium sp. 3*.

Les figures 219, 220, 221, 222 et 223 représentent les chromatogrammes des cinq phases obtenues après ensemencement avec *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3*.

Les figures 224, 225 et 226 représentent les chromatogrammes des phases non silylées obtenues après 2 jours, 4 jours et 8 jours après ensemencement avec la culture mixte.

L'ensemble des molécules identifiées ou supposées est rapporté dans le tableau 31 pour les échantillons *Agrobacterium sp. 2*, dans le tableau 32 pour les échantillons *Corynebacterium sp. 3* et dans les tableaux 33 et 34 pour les échantillons de la culture mixte respectivement silylés et non silylés.

Les pics de produits identifiés ou supposés sont numérotés de 1 à n par ordre d'apparition sur les chromatogrammes, le premier chromatogramme correspondant à la phase de 2 jours de la culture *Agrobacterium sp. 2* (Figure 209 en annexe), le dernier à la phase non silylée de 8 jours de la culture mixte (Figure 226 en annexe).

Les pics des produits retrouvés dans le témoin sont annotés d'un T, les pics inconnus d'un I et les pics de solvant ou réactifs de silylation d'un S.

Les résultats présentés ne sont pas quantitatifs, l'analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse n'ayant pas été choisie dans ce but. Cette technique a seulement pour but d'identifier les métabolites de dégradation.

Le spectre de masse, la formulation et le nom des molécules identifiées ou supposées sont présentés dans les Annexes 1, 10, 11, 12 et 13.

a.1) Culture *Agrobacterium sp. 2*

Vingt molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons dichlorométhane obtenus entre 2 et 8 jours de culture avec *Agrobacterium sp. 2*. Le substrat était le carbazole à la concentration de 10 g/l, les conditions C/N/P = 100/5/1, les tensioactifs étaient présents chacun à raison de 2,5 ml/l de milieu.

Les différentes molécules sont rassemblées dans le tableau 31.

Du tableau 31 ressortent les observations suivantes :

- . Le carbazole soluble dans le milieu de culture est présent dans les cinq échantillons.
- . La technique de silylation semble tout à fait correcte, puisque la totalité du carbazole contenu dans les échantillons est silylée.
- . *Agrobacterium sp. 2* semble capable, à partir du troisième jour, de solubiliser les impuretés du carbazole (méthylcarbazoles, fluoranthène, pyrène).
- . *Agrobacterium sp. 2* semble capable de dégrader les impuretés du carbazole (absence au huitième jour), de dégrader l'antioxydant (conservateur des tensioactifs) (absence à partir du

Tableau 31 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée ou supposée dans les cinq phases dichlorométhane silylées de la cultureensemencée avec *Agrobacterium sp. 2* ; les cinq échantillons proviennent des prélèvements effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture.

		Age de la phase dichlorométhane (j)					Classement des spectres de masse
		2	3	4	6	8	
Nom & numérotation de la molécule							
Tétra oxy éthylène ou propylène silylé	1 T	+	+	-	-	+	Annexe 10
	6 T	+	+	+	+	+	Annexe 10
	7 T	+	+	-	-	+	Annexe 10
	8 T	+	+	-	-	+	Annexe 10
	14 T	-	+	-	-	-	Annexe 10
Hydroxy benzoate silylé	2 T	+	+	+	+	+	Annexe 10
Hydroxy benzène Acétate silylé	3 T	+	+	+	+	+	Annexe 10
Fragments de tensioactifs P94 et P103	4	+	+	+	+	+	Annexe 10
	13	+	+	+	+	+	Annexe 10
	19	-	-	+	+	+	Annexe 10
Carbazole silylé	5 T	+	+	+	+	+	Annexe 11
Dérivé du cyclohexane	9	+	-	-	-	-	Annexe 12
Dérivé du poly- cyclohexane	10	+	?	-	-	?	Annexe 12
Acide benzoïque silylé	11	-	+	-	-	-	Annexe 13
Anti oxydant	12 T	-	+	+	-	-	Annexe 10
Méthyl carbazole silylé	15	-	+	+	+	-	Annexe 11
	16	-	+	+	+	-	Annexe 11
Fluoranthène	17	-	+	+	+	-	Annexe 1
Pyrène	18	-	+	+	+	-	Annexe 1
Dérivé poly- cyclohexane	21	-	?	+	-	?	Annexe 12

? signifie que le produit n'a pas été recherché.

T signifie que les produits identifiés l'ont été dans les Témoins.

sixième jour), de dégrader les tensioactifs (présence de trois fragments pratiquement en permanence).

- . Des composés extracellulaires produits par *Agrobacterium sp. 2* sont retrouvés aux deuxième et quatrième jours (dérivés du cyclohexane et polycyclohexane).

- . *Agrobacterium sp. 2* ne semble pas dégrader les deux impuretés de provenance inconnue, correspondant aux acides hydroxybenzoïque et hydroxybenzène acétique, puisqu'ils sont présents à tout moment, à moins que le probable acide benzoïque, observé au troisième jour, corresponde à un de leur produit de dégradation.

- . Le probable acide benzoïque observé le troisième jour semble correspondre au seul métabolite de dégradation observé dans cette phase.

a.2) Culture *Corynebacterium sp. 3*

Dix-neuf molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons dichlorométhane obtenus entre deux et huit jours de culture avec *Corynebacterium sp. 3* ; le substrat était le carbazole à la concentration de 10 g/l, les conditions C/N/P = 100/5/1, les tensioactifs étaient présents chacun à raison de 2,5 ml/l de milieu.

Les différentes molécules sont rassemblées dans le tableau 32.

Du tableau 32 ressortent les observations suivantes :

- . Le carbazole est présent dans les cinq échantillons sous sa forme soluble.
- . La technique de silylation a donné de moins bons résultats qu'avec les échantillons de *Agrobacterium sp. 2*, puisque du carbazole et du méthylcarbazole ont été retrouvés non silylés. Il n'empêche qu'elle demeure nécessaire pour identifier les molécules hydroxylées et carboxylées.
- . Comme *Agrobacterium sp. 2*, *Corynebacterium sp. 3* semble capable, à partir du troisième jour, de solubiliser les impuretés du carbazole (méthyl-carbazole, méthyl-phénanthrène ou/et anthracène, fluoranthène, pyrène).
- . L'antioxydant présent dans les milieux de culture en tant que conservateur des tensioactifs P94 et P103 n'a pas été retrouvé dans les cinq échantillons. Il est probable que la molécule a été utilisée comme substrat par la bactérie *Corynebacterium sp. 3*.

Tableau 32 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée dans les cinq phases dichlorométhane silylées de la cultureensemencée avec *Corynebacterium sp.3* ; les cinq échantillons correspondent aux prélèvements effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture.

		Age de la phase dichlorométhane (j)					Classement des spectres de masse
		2	3	4	6	8	
Nom & numérotation de la molécule							
Carbazole	20 T	+	+	+	+	+	Annexe 1
Carbazole silylé	5 T	+	+	+	+	+	Annexe 11
Méthyl anthracène ou/et phénanthrène	22	-	+	+	+	+	Annexe 11
Méthylcarbazole	23	-	+	+	+	-	Annexe 1
Fluoranthène	17	-	+	+	+	+	Annexe 1
Pyrène	18	-	+	+	+	+	Annexe 1
Fragments des tensioactifs P94 et P103	24	-	+	+	+	-	Annexe 10
	25	-	+	+	+	+	Annexe 10
	26	-	+	+	+	+	Annexe 10
	27	-	+	+	+	+	Annexe 10
	28	-	-	+	-	-	Annexe 10
	29	-	-	+	-	-	Annexe 10
	30	-	-	+	-	-	Annexe 10
	31	-	-	+	+	-	Annexe 10
	32	-	-	+	-	-	Annexe 10
	33	-	-	+	-	-	Annexe 10
	34	-	-	+	-	-	Annexe 10
	35	-	-	+	-	-	Annexe 10
	36	-	-	+	-	-	Annexe 10

. *Corynebacterium sp. 3* dégrade les tensioactifs en produisant de nombreux métabolites (quatrième jour), qu'elle consomme rapidement ensuite.

. Les molécules de tétraoxyéthylène ou propylène sont utilisées comme substrat par les bactéries, puisqu'elles ne sont retrouvées dans aucun échantillon.

a.3) Culture *Agrobacterium sp. 2* + *Corynebacterium sp. 3*

Trente et une molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons dichlorométhane obtenus entre deux et huit jours de culture avec *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* (Tableau 33). Le substrat était le carbazole à la concentration de 10 g/l, les conditions C/N/P = 100/5/1, les tensioactifs étaient présents chacun à raison de 2,5 ml/l de milieu.

Les échantillons prélevés après 2, 4 et 8 jours de culture ont été analysés par la même méthode, mais sans dérivation préalable.

Dans ces conditions, seulement treize molécules ont été retrouvées au lieu de trente et une. Ce résultat montre l'intérêt de la dérivation préalable (silylation, cf. 3.7.9.4.) dans l'étude des produits de dégradation dans les milieux de culture.

Des tableaux 33 et 34 ressortent les observations suivantes :

- . Le carbazole est présent dans les cinq échantillons sous sa forme soluble.
- . *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* sont capables de solubiliser les impuretés du carbazole, et ceci dès le deuxième jour.
 - Cette solubilisation se fait plus rapidement que dans les deux cultures pures, soit parce que les pouvoirs de solubilisation des deux bactéries se conjuguent, soit parce que leur population étant plus importante dans la culture mixte, la solubilisation est plus rapide.
 - Les tensioactifs silylés masquent parfois certains pics. C'est ainsi que dans l'échantillon silylé de huit jours, ne sont pas retrouvés l'anthracène, le phénanthrène, le fluo-ranthène et le pyrène, alors que dans l'échantillon non silylé ils sont bien présents.
- . Les phases non silylées ont permis de mettre en évidence la présence de trois molécules de méthyl-phénanthrène ou/et anthracène et une molécule d'acridine ou de benzoquinoline ou de phénanthridine. L'analyse du carbazole (Annexe 1) n'avait livré que deux molécules de méthylphénanthrène ou/et anthracène.

Tableau 33 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée ou supposée, dans les cinq phases dichlorométhane silylées de la culture ensemencée avec *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3* ; les échantillons correspondent aux prélèvements effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture.

		Age de la phase dichlorométhane (j)					Classement des spectres de masse
		2	3	4	6	8	
Nom & numérotation de la molécule							
Tétra oxy éthylène ou propylène silylé	1 T	+	+	+	+	-	Annexe 10
	6 T	+	+	+	+	-	Annexe 10
	7 T	+	+	+	+	-	Annexe 10
	8 T	+	+	+	+	-	Annexe 10
	14 T	+	+	+	+	-	Annexe 10
	43 T	+	+	-	+	-	Annexe 10
	44 T	+	-	-	+	-	Annexe 10
	45 T	+	-	-	-	-	Annexe 10
Fragments de tensioactifs P94 et P103	24	+	+	+	+	+	Annexe 10
	25	+	+	+	+	+	Annexe 10
	26	-	+	+	+	+	Annexe 10
	27	-	+	-	+	+	Annexe 10
	28	-	+	-	+	-	Annexe 11
	29	-	+	-	+	-	Annexe 10
	30	-	+	-	+	-	Annexe 10
	31	-	-	-	+	-	Annexe 10
	35	-	-	-	+	-	Annexe 10
	36	-	-	-	+	-	Annexe 10
Carbazole silylé	5 T	+	+	+	+	+	Annexe 11
Méthylcarbazole silylé	15	+	+	+	-	+	Annexe 11
	16	+	+	+	-	+	Annexe 11
Anthracène	37	+	+	+	-	-	Annexe 1
Phénanthrène	38	+	+	+	-	-	Annexe 1
Méthylphénanthrène ou/et anthracène	22	+	+	+	-	-	Annexe 11
Fluoranthène	17	+	+	+	-	-	Annexe 1
Pyrène	18	+	+	+	-	-	Annexe 1
Acide palmitique silylé	40	+	+	+	+	-	Annexe 12
Acide stéarique silylé	41	+	+	+	-	-	Annexe 12
Hydroxyméthyl carbazole silylé	39	+	+	-	-	-	Annexe 13
Anthracène dione ou phénanthrène dione	46	-	-	+	-	-	Annexe 13
Phtalate	42	+	+	+	+	-	Annexe 10

Tableau 34 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée ou supposée dans les trois phases dichlorométhane non silylées ; les échantillons correspondent aux prélèvements effectués 2, 4 et 8 jours après ensemencement avec *Agrobacterium* sp. 2 et *Corynebacterium* sp. 3.

		Age de la phase dichlorométhane (j)			Classement des spectres de masse
		2	4	8	
Nom & numérotation de la molécule					
3-méthylphénanthrène ou/et anthracène	2 2	+	+	+	Annexe 11
	2 2	+	+	+	Annexe 11
	2 2	+	+	+	Annexe 11
Fragment de tensioactifs	4 8	+	+	+	Annexe 10
	4 9	-	-	+	Annexe 10
Anthracène	3 7	+	+	+	Annexe 1
Phénanthrène	3 8	+	+	+	Annexe 10
Acridine ou benzoquinoline ou phénanthridine	4 7	+	+	-	Annexe 10
Carbazole	20 T	+	+	+	Annexe 10
Méthylcarbazole	2 3	+	+	-	Annexe 1
Fluoranthène	1 7	+	+	+	Annexe 1
Pyrène	1 8	+	+	+	Annexe 1
Phtalate	4 2	+	+	+	Annexe 10

Le fait de concentrer à sec la phase dichlorométhane, après avoir éliminé le carbazole insoluble du milieu de culture, a permis d'observer une impureté du carbazole supplémentaire, présente en très faible quantité dans l'échantillon.

- . La silylation du méthylcarbazole permet de séparer deux isomères de cette molécule, alors que l'absence de silylation ne le permet pas.

- . L'antioxydant présent dans le témoin sans bactéries et dans les tensioactifs P94 et P103 n'a pas été retrouvé dans les cinq phases dichlorométhane de la culture mixte. Le conservateur a donc été utilisé comme source de carbone par les bactéries de la culture mixte. Ceci correspond à l'observation faite avec la culture pure *Corynebacterium sp. 3*.

- . La culture mixte dégrade les tensioactifs en produisant de nombreux métabolites (troisième et sixième jours) qui sont ensuite utilisés comme substrat (quatrième et huitième jours). Cette observation correspond aux résultats déjà obtenus avec la culture pure *Corynebacterium sp. 3*.

- . Certains fragments de tensioactifs sont retrouvés sans silylation ; cela signifie que leur biotransformation ne produit pas dans tous les cas des fragments dont les extrémités sont polaires, puisqu'il est possible d'en identifier sans les dériver.

- . Deux acides gras sont retrouvés et correspondent, soit à des tensioactifs relargués par les bactéries, soit à des débris cellulaires (lyse des cellules) ; seules les phases dichlorométhane de la culture mixte présentent des acides gras.

Leurs propriétés hydrophobe et hydrophile font qu'ils sont aussi bien solubles dans la phase dichlorométhane que dans la phase diméthylformamide. L'étude des phases diméthylformamide (cf. b)) montrera qu'ils sont retrouvés dans la culture pure *Agrobacterium* et dans la culture mixte.

Il semble que la solubilité des acides gras soit déplacée en faveur de la phase diméthylformamide. Il faut probablement que la concentration en acides gras atteigne une certaine valeur dans le milieu de culture pour que leur présence puisse être détectée dans une phase dichlorométhane.

De ce fait, la concentration en acide gras doit être plus élevée dans la culture mixte que dans les cultures pures.

- . La présence du phtalate est due aux produits de vaisselle de la verrerie du laboratoire ; il ne faut pas négliger sa présence dans le milieu de culture, puisqu'il peut être utilisé comme substrat par les bactéries (cf. 2.3.3.8.) et aboutir à la production de métabolites qu'il faudra différencier des métabolites du carbazole.

. Deux métabolites de dégradation ont été détectés : l'hydroxyméthylcarbazole et l'anthracène ou phénanthrène dione. Ces métabolites proviennent de la dégradation des impuretés du carbazole.

. La technique de silylation semble tout à fait correcte (comme pour les échantillons d'*Agrobacterium* sp. 2) puisque dans tous les cas, le carbazole contenu dans les échantillons était silylé. Seul l'atome d'azote de l'hydroxyméthylcarbazole n'a pas été silylé, probablement pour des raisons de gêne stérique.

b) Les phases diméthylformamide

Tous les chromatogrammes sont rassemblés en Annexe 9 (Figures 227 à 241).

Les figures 227, 228, 229, 230 et 231 représentent les chromatogrammes des phases obtenues 2 jours, 3 jours, 4 jours, 6 jours et 8 jours après ensemencement par *Agrobacterium* sp. 2.

Les figures 232, 233, 234, 235 et 236 représentent les chromatogrammes des phases obtenues 2 jours, 3 jours, 4 jours, 6 jours et 8 jours après ensemencement par *Corynebacterium* sp. 3.

Les figures 237, 238, 239, 240 et 241 représentent les chromatogrammes des phases obtenues 2 jours, 3 jours, 4 jours, 6 jours et 8 jours après ensemencement par *Agrobacterium* sp. 2 et *Corynebacterium* sp. 3.

L'ensemble des molécules identifiées ou supposées est rapporté dans le tableau 35 pour les échantillons *Agrobacterium* sp. 2, dans le tableau 37 pour les échantillons *Corynebacterium* sp. 3 et dans le tableau 37 pour les échantillons de la culture mixte.

Les pics des produits sont numérotés de la même façon que pour les phases dichlorométhane.

Les pics des produits identifiés ou supposés, retrouvés dans le témoin, sont annotés d'un T, les pics inconnus d'un I et les pics de solvant ou réactifs de silylation d'un S.

Le spectre de masse, la formulation et le nom des molécules identifiées ou supposées, sont présentés en Annexe 1, 10, 11, 12 et 13.

b.1) Culture *Agrobacterium* sp. 2

Vingt-six molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq extraits diméthylformamide obtenus entre 2 et 8 jours de culture avec *Agrobacte-*

rium sp. 2. Le substrat était le carbazole à la concentration de 10 g/l, les conditions C/N/P = 100/5/1 et les tensioactifs étaient présents chacun à raison de 2,5 ml/l de milieu.

L'ensemble des molécules est rassemblé dans le tableau 35.

Tableau 35 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée ou supposée dans les phases diméthylformamide silylées ; les cinq échantillons correspondent aux prélèvements effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture.

		Age de la phase diméthylformamide (j)					Classement des spectres de masse
		2	3	4	6	8	
Nom & numérotation de la molécule							
Tétra oxy éthylène ou propylène silylé	1 T	+	-	-	-	-	Annexe 10
	6 T	-	-	+	+	+	Annexe 10
	7 T	-	-	+	+	+	Annexe 10
	8 T	-	-	+	+	+	Annexe 10
	43 T	-	-	+	+	+	Annexe 10
	44 T	-	-	+	+	+	Annexe 10
	51 T	+	-	-	-	+	Annexe 10
	58 T	+	-	-	-	-	Annexe 10
Fragments de tensioactifs P94 et P103	25	-	-	+	+	-	Annexe 10
	26	-	-	+	+	+	Annexe 10
	27	-	-	+	+	+	Annexe 10
Carbazole	20 T	-	-	+	-	-	Annexe 1
Carbazole silylé	5 T	-	+	+	+	+	Annexe 11
Sucres	52	+	-	-	-	-	Annexe 12
	53	+	-	-	-	-	Annexe 12
	54	+	-	-	-	-	Annexe 12
	55	+	-	-	-	-	Annexe 12
	59	-	+	-	-	-	Annexe 12
Polyols	56	+	-	-	-	-	Annexe 12
	57	+	-	-	-	-	Annexe 12
Acides gras	40	-	+	+	+	+	Annexe 12
	41	+	+	+	+	+	Annexe 12
Aminométhyl cyclohexadiène	50	+	-	-	-	-	Annexe 13
Formyl-Aminométhyl cyclohexane	60	-	+	-	-	-	Annexe 13
Phosphate	61	-	-	-	+	-	Annexe 10
Hydrométhyl carbazole	39	-	-	+	-	-	Annexe 13

Du tableau 35 ressortent les observations suivantes :

. Les fragments de tensioactifs P94 et P103 identifiés à partir du quatrième jour avaient déjà été observés dans les phases dichlorométhane de la culture *Corynebacterium sp.* 3 et de la culture mixte. Par contre, ils n'étaient pas présents dans les cinq phases dichlorométhane de la culture *Agrobacterium sp.* 2.

Il est donc probable que les fragments identifiés ont une polarité relativement importante avec la présence, par exemple, de groupements carboxyliques.

. Des traces de carbazole sont observées dans les échantillons.

. Différents sucres et polyols (glucitol et ribitol) sont observés le deuxième jour. Ceux-ci sont produits par la bactérie ou relargués par lyse cellulaire. Cependant, la bactérie les a rapidement utilisés comme substrat. De plus, cette observation nous montre que le protocole de travail utilisé permet d'analyser des molécules fragiles, comme c'est le cas ici avec les sucres.

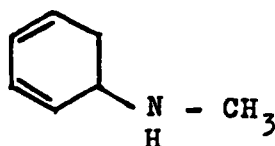
. Deux acides gras ont été observés. Les acides gras ont soit été produits par les bactéries comme tensioactifs, soit ils proviennent de la lyse cellulaire.

. La présence de phosphates dans l'échantillon du sixième jour montre que le diméthylformamide peut solubiliser des sels minéraux et pas seulement des composés organiques.

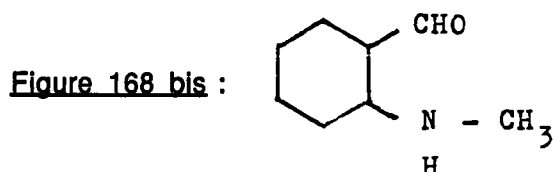
. Trois produits de dégradation du carbazole ou/et du méthylcarbazole semblent avoir été détectés :

- 1° L'hydroxyméthylcarbazole déjà observé auparavant (détecté au quatrième jour).
- 2° Un composé pouvant correspondre à un aminométhylcyclohexadiène (détecté au deuxième jour) dont une formule possible est donnée sur la figure 168 :

Figure 168 :



- 3° Un composé correspondant certainement au formyl1-aminométhyl2-cyclohexane (détecté au troisième jour) dont la formule est donnée sur la figure 168 bis :



b.2) Culture *Corynebacterium* sp. 3

Neuf molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq extraits diméthylformamide obtenus entre deux et huit jours de culture avec *Corynebacterium* sp. 3. Le substrat était le carbazole à la concentration de 10 g/l, les conditions C/N/P = 100/5/1 et les tensioactifs étaient présents chacun à raison de 2,5 ml/l de milieu.

L'ensemble des molécules est rassemblé dans le tableau 36.

Du tableau 36 ressortent les observations suivantes :

- . Le carbazole est retrouvé dans les cinq échantillons et seulement à l'état de traces dans les échantillons du deuxième, troisième et quatrième jour de culture.
- . Les rendements de silylation du carbazole sont assez faibles pour ces cinq échantillons.
- . Les fragments de tensioactifs sont retrouvés à partir du quatrième jour (ils apparaissent dès le troisième jour dans les phases dichlorométhane).
- . Des traces de chlorocarbazole sont observées. Celui-ci n'ayant pas été repéré dans les impuretés du carbazole (Merck 820255) (Annexe 1), il peut y avoir deux raisons à sa présence :
 - réaction photochimique du carbazole avec le dichlorométhane,
 - il existe tout de même dans le témoin, mais à très faible concentration. Sa solubilisation dans le diméthylformamide et sa concentration à sec ont permis de le mettre en évidence.
- . L'acide palmitique n'a été observé que dans l'échantillon du deuxième jour. Il s'agit probablement de matériel provenant de la lyse cellulaire.

Tableau 36 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée ou supposée dans les cinq phases diméthylformamide silylées de la cultureensemencée avec *Corynebacterium sp. 3* ; les échantillons correspondent aux prélèvements effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture.

		Age de la phase diméthylformamide (j)					Classement des spectres de masse
		2	3	4	6	8	
Nom & numérotation de la molécule							
Fragments	24	-	-	+	+	+	Annexe 10
de	25	-	-	+	+	+	Annexe 10
tensioactifs	26	-	-	+	+	+	Annexe 10
P94 et P103	27	-	-	+	+	+	Annexe 10
Carbazole	20 T	+	+	+	+	+	Annexe 1
Carbazole silylé	5 T	+	-	+	+	+	Annexe 11
Chlorocarbazole	62	+	-	+	-	-	Annexe 11
PO ₄ (TMS) ₃	61	+	+	-	+	-	Annexe 10
Acide gras	40	+	-	-	-	-	Annexe 12

b.3) Culture *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3*

Quinze molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq extraits diméthylformamide obtenus entre deux et huit jours de culture avec la culture mixte *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3*. Le substrat était le carbazole à la concentration de 10 g/l, les conditions C/N/P = 100/5/1 et les tensioactifs étaient présents chacun à raison de 2,5 ml/l de milieu.

L'ensemble des molécules est rassemblé dans le tableau 37.

Tableau 38 : Présence (+) ou absence (-) des produits dont la structure est identifiée ou supposée dans les phases diméthylformamide silylées ; les échantillons correspondent aux prélèvements effectués après 2, 3, 4, 6 et 8 jours de culture avec *Agrobacterium sp. 2* et *Corynebacterium sp. 3*.

		Age de la phase diméthylformamide (j)					Classement des spectres de masse
		2	3	4	6	8	
Nom & numérotation de la molécule							
Tétra oxy éthylène ou/et propylène	6 T	+	-	+	-	+	Annexe 10
	7 T	+	-	-	-	+	Annexe 10
	14 T	-	-	+	+	+	Annexe 10
	51 T	+	-	-	-	+	Annexe 10
Fragments de tensioactifs P94 et 9103	25	-	-	+	+	-	Annexe 10
	26	+	+	+	+	-	Annexe 10
Carbazole silylé	5 T	-	-	+	-	-	Annexe 11
Sucres	65	-	-	-	+	-	Annexe 12
	66	-	-	-	+	-	Annexe 12
Acide uronique	64	-	-	-	+	-	Annexe 12
Acides gras	40	+	+	+	+	+	Annexe 12
	41	+	+	+	+	+	Annexe 12
Glycérophosphoryl glycérol	63	-	-	+	+	+	Annexe 12
Phtalate	42	+	-	-	-	-	Annexe 10
Phosphate	61	+	-	-	+	+	Annexe 10

Du tableau 37 ressortent les observations suivantes :

. Le carbazole n'apparaît que dans l'échantillon du quatrième jour (et à l'état de traces). La solubilisation du carbazole dans le dichlorométhane a été presque totale, puisqu'il n'a pratiquement pas été retrouvé dans les échantillons qui ont suivi l'extraction au dichlorométhane.

. Des fragments de tensioactifs sont retrouvés jusqu'au sixième jour inclus. Les fragments sont ensuite utilisés comme substrat comme les phases dichlorométhane l'avaient montré.

. La présence des acides gras était prévisible, puisqu'ils avaient déjà été identifiés dans les phases dichlorométhane.

. Le glycérophosphorylglycérol observé du quatrième jour au huitième jour, correspond à un biotensioactif produit par les bactéries pour, très probablement, solubiliser le carbazole. Il est possible que les acides gras jouent un rôle similaire.

6.4. DISCUSSION

L'analyse en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence de nombreuses molécules. Ce chapitre discute de leur provenance et de leur utilité pour les bactéries.

6.4.1. DEGRADATION DES MOLECULES PRESENTES DANS LES MILIEUX DE CULTURE

Les bilans en carbazole (cf. 5.3.2.a.) ont montré que le carbazole était utilisé comme source de carbone. Cependant, comme les chromatogrammes l'ont indiqué, le carbazole n'a pas été la seule source de carbone consommée par les bactéries.

Les autres sources de carbone sont les suivantes :

- les tensioactifs P94 et P103,
- les molécules hydroxybenzoate et hydroxybenzène acétate de provenance inconnue,
- le conservateur (antioxydant) ajouté dans les tensioactifs P94 et P103,
- les impuretés du carbazole dissoutes dans les milieux de culture,
- et peut-être le phtalate retrouvé à plusieurs reprises.

La dégradation des tensioactifs P94 et P103 observée avec la bactérie *Corynebacterium sp.3* dépend des groupements terminaux de ces molécules. Ces tensioactifs ayant été synthétisés par réaction de polymérisation, leur formulation peut correspondre, par exemple, à la représentation suivante :



Le groupement méthyl terminal peut subir une oxydation bactérienne pour aboutir à la formation d'un acide carboxylique, après être passé par les intermédiaires alcool et aldéhyde.

Le groupement hydroxylique terminal peut subir la même oxydation bactérienne (Leadbetter & Foster, 1960 ; Nakajima *et al.*, 1974 ; Atlas, 1981).

L'oxydation peut s'accomplir sur un seul groupement terminal, mais il peut y avoir aussi formation d'un diacide carboxylique terminal, comme cela a été observé lors de la dégradation du pristane avec *Corynebacterium* souche RTMP - S (Mc Kenna & Kallio, 1971).

L'acide carboxylique formé, la bactérie peut utiliser les tensioactifs comme source de carbone (Figure 169).

La dégradation des tensioactifs peut correspondre à la perte successive de deux carbones (sous forme d'acide acétique), ce qui expliquerait l'observation à plusieurs reprises dans la culture pure de *Corynebacterium sp.* 3 et dans la culture mixte d'une succession de pics chromatographiques, correspondant à des fragments de tensioactifs de poids moléculaire différent, que l'analyse fait apparaître irrégulièrement (Figures 216, 220, 222 situées en Annexe).

Le système enzymatique NADH - Flavoprotéine - Cytochrome P450 serait responsable de la phase d'hydroxylation des alcanes chez *Corynebacterium sp.* (Cardini & Jurtschuk, 1970). Similairement, les molécules tétraoxyéthyléniques ou propyléniques ont subi la même dégradation dans la culture de *Corynebacterium sp.* 3.

Quant aux molécules hydroxybenzoate et hydrobenzèneacétate retrouvées comme impuretés dans le témoin, elles ont été utilisées comme source de carbone par la bactérie *Corynebacterium sp.* 3.

Leur assimilation se ferait en deux grandes étapes :

1° Dihydroxylation du cycle aromatique, avec élimination des groupements carboxyliques (CO₂ et acide acétique) pour former un polyhydroxybenzène (catéchol, pyrogallol...).

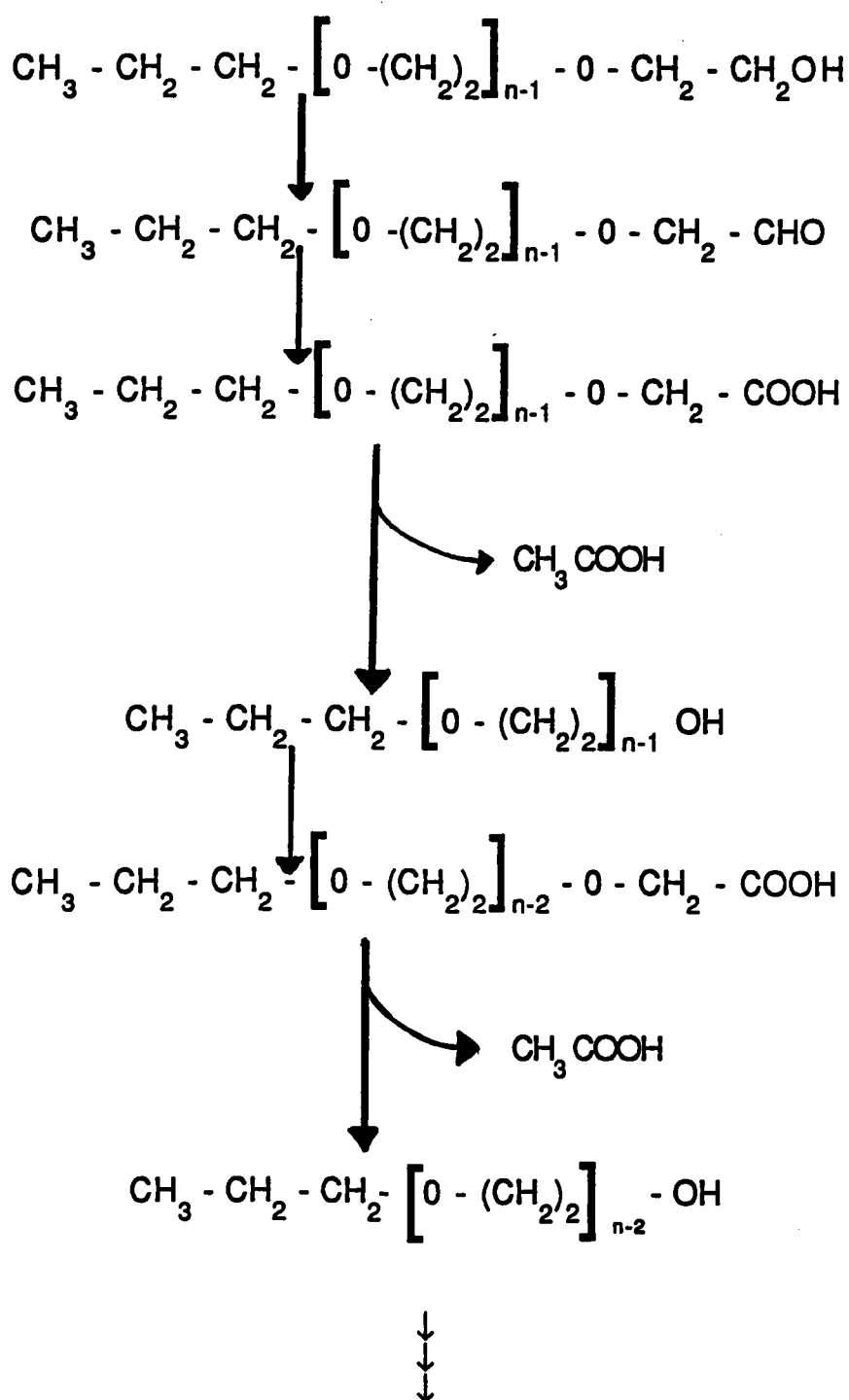
2° Clivage en ortho ou en méta du cycle benzénique avec assimilation sous forme de pyruvate et d'acétaldéhyde.

Ce mécanisme correspondrait au mécanisme de dégradation du naphthalène (cf. 2.3.3.4.) (Davies & Evans, 1964 ; Barnsley, 1976 ; Ribbons & Eaton, 1982 ; Cerniglia, 1984a et 1984b).

Il est probable que l'antioxydant ajouté dans les tensioactifs P94 et P103 subisse les mêmes transformations.

En ce qui concerne les impuretés du carbazole (phénanthrène, anthracène, méthylphénanthrène, méthylanthracène, méthylcarbazole, pyrène, fluoranthène), l'expérimentation a montré que ces molécules ont été dissoutes dans le milieu de culture et utilisées comme source de carbone par les bactéries.

Les mécanismes de dégradation du phénanthrène et de l'anthracène sont bien connus (Evans *et al.*, 1965 ; Kiyohara *et al.*, 1976).



Assimilation totale

Figure 169 : Mécanisme probable de dégradation des tensioactifs P94 et P103.

Quant à ceux des méthylphénanthrènes ou/et anthracène, ils sont similaires avec peut-être une oxydation du substituant en alcool, aldéhyde et acide carboxylique comme c'est le cas avec les composés naphthaléniques alkyl substitués en présence du genre *Pseudomonas* (Ribbons & Eaton, 1982).

L'expérimentation ayant montré que le carbazole était utilisé comme substrat par les bactéries, il est probable qu'il en est de même avec le méthylcarbazole.

En ce qui concerne le fluoranthène et le pyrène, leur mécanisme de dégradation n'est pas bien connu. Il est cependant probable qu'ils subissent des réactions de dihydroxylation, comme c'est le cas avec le benzo [a] pyrène (Gibson *et al.*, 1975 ; Barnsley, 1975).

Quant au phtalate, s'il était déjà présent dans le milieu de culture (ce qui n'est pas démontré), il peut être dégradé comme les travaux de Eaton & Ribbons (1982) et O'Grady *et al.* (1985) l'ont montré.

6.4.2. PRODUCTION DES METABOLITES DETECTES

. Le composé qui semble correspondre à l'hydroxyméthylcarbazole peut être un métabolite de dégradation du méthylcarbazole qui avait été retrouvé comme impureté du carbazole. Le méthylcarbazole subit logiquement la même biotransformation que le carbazole (dihydroxylation d'un cycle aromatique, clivage du cycle...). Cependant, comme c'est le cas avec les dérivés naphthaléniques alkylsubstitués, des réactions secondaires d'oxydation du substituant peuvent être observées (Ribbons & Eaton, 1982).

L'hydroxyméthylcarbazole correspond certainement à un produit de dégradation secondaire. Il montre en tout cas, que les impuretés du carbazole peuvent être utilisées comme substrat par les bactéries.

. Le composé qui semble correspondre à l'acide benzoïque est déjà plus surprenant. En effet, peu de mécanismes de dégradation produisent de l'acide benzoïque. La dégradation du toluène (Ribbons & Eaton, 1982), des monoalkylbenzènes dont la chaîne a un nombre impair de carbone (Rontani *et al.*, 1985a) peuvent produire de l'acide benzoïque comme métabolite.

Cependant, de telles sources de carbone n'ont pas été observées dans les milieux de culture. L'acide benzoïque ne peut donc pas provenir de telles dégradations. Par contre, la production d'acide benzoïque a été observée lors de la décarboxylation de l'acide phtalique (Rontani *et al.*, 1985b). Or, l'acide phtalique peut être produit lors de la dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas aeruginosa* (Evans *et al.*, 1965) et par *Aeromonas sp.* (Kiyohara *et al.*, 1976) ou bien lors de la dégradation des phtalates (Eaton & Ribbons, 1982 ; O'Grady *et al.*, 1985).

Cependant, ce mécanisme de production d'acide benzoïque n'est pas ordinaire, puisque pour le phénanthrène et les phtalates, l'acide phtalique est le précurseur du protocatéchuate.

. Le composé qui correspond à l'anthracène dione ou phénanthrène dione peut être un métabolite de dégradation de l'anthracène ou du phénanthrène, si une réaction de déshydrogénation se produit sur le métabolite cis-diol qui est rencontré habituellement lors de leurs dégradations (Evans *et al.*, 1965 ; Kiyohara *et al.*, 1976).

. Le composé qui semble correspondre au méthylaminocyclohexadiène peut être un métabolite obtenu lors de réactions de dégradation particulières (Figure 168).

En effet, il peut s'agir d'un métabolite de dégradation du carbazole ou/et du méthylcarbazole ayant subi la rupture de l'hétérocycle, comme le laisse prévoir la dégradation de la pyridine par *Micrococcus lateus* (Sims *et al.*, 1986) ou du tryptophane par *Pseudomonas putida* (Hegeman, 1966). Cependant, le cycle aromatique a subi une hydrogénation partielle.

Cette hydrogénation peut être caractéristique d'une oxygénation insuffisante de l'ensemble du milieu de culture. En effet, une hydrogénation similaire du cycle a été observée lors de la dégradation de trihydroxybenzoates par *Pelobacter acidigallici* en anaérobiose (Samain *et al.*, 1986).

. Le composé qui semble correspondre au formyl 1-méthylamino 2-cyclohexane (Figure 168bis) peut être un métabolite de dégradation du carbazole ou/et du méthylcarbazole et présente les mêmes caractéristiques que la précédente molécule.

En effet, la déaromatisation d'un cycle aromatique est caractéristique d'un milieu de culture dont l'oxygénation est insuffisante. Une hydrogénation similaire a été observée lors de la dégradation de l'acide benzoïque en anaérobiose par le microorganisme *Rhodopseudomonas palustris* (Hutber & Ribbons, 1983).

Le cycle pour être dégradé doit subir le même mécanisme de dégradation que celui des cycloalcanes (Tsukamoto *et al.*, 1975 et 1977 ; Blakley, 1978) avant d'être assimilé par β -oxydation.

6.4.3. LE MATERIEL CELLULAIRE

. Deux acides gras (l'acide palmitique C₁₆ et stéarique C₁₈) ont été détectés sous leur forme triméthylsilylée en spectrométrie de masse dans la culture pure *Agrobacterium sp. 2* et dans la culture mixte.

Leurs spectres de masse sont tout à fait similaires à celui de l'acide décanoïque silylé étudié par Tulloch (1985). Les ions m/z 73, 75, 117, 129, 131, 132 et M-15 étant les plus intenses.

Les acides gras peuvent être utilisés (même s'ils proviennent de la lyse cellulaire) comme tensioactifs (Kretschmer *et al.*, 1982 ; Cooper *et al.*, 1981 ; Rehm & Reiff, 1981) pour solubiliser les hydrocarbures hydrophobes. Ils peuvent être utilisés aussi comme substrat par les bactéries et assimilés par β -oxydation (Atlas, 1981).

. Un biotensioactif correspondant à l' α -glycérophosphorylglycérol appartenant à la famille des tensioactifs bactériens phosphatidyldiglycérine (Makula *et al.*, 1975 ; Vachon *et al.*, 1982) a été identifié par spectrométrie de masse (Figure 170).

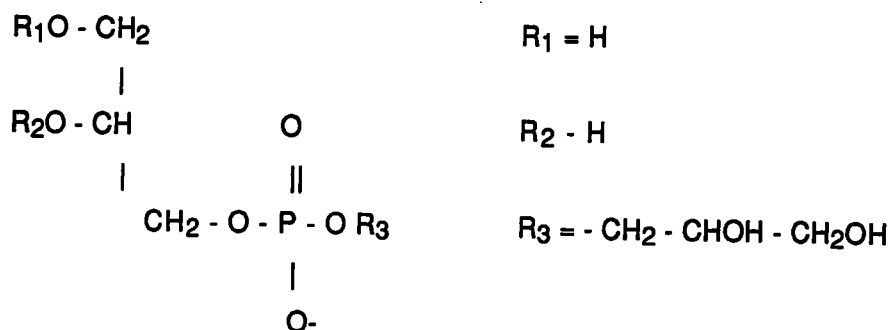


Figure 170 : Formulation de l' α -glycérophosphorylglycérol.

Le spectre de masse est tout à fait similaire à celui présenté par Wood (1980).

Absent dans les cultures pures, le biotensioactif n'a été observé que dans la culture mixte. Ce phénomène n'est pas unique puisque Mattei & Bertrand (1985) utilisent une culture mixte pour produire un biotensioactif lors de la dégradation du pétrole brut.

. De nombreux sucres ont été détectés par spectrométrie de masse. Ils peuvent provenir de la lyse des cellules ou bien de leur excrétion par les bactéries sous diverses formes comme par exemple, les biotensioactifs esters de tréhalose (Bloch, 1950), les sophorolipides (Ito & Inoue, 1982) et les rhamnolipides (Edwards & Hayashi, 1965).

En définitive, aucune molécule de structure indolique n'a été identifiée. C'est pourquoi, l'étude de la dégradation du carbazole doit se poursuivre dans de nouvelles conditions et d'autres microorganismes.

D'autre part, pour augmenter la biodisponibilité du carbazole, l'acide carbazole monosulfonique sera utilisé dans les expériences suivantes comme source de carbone.

7. METABOLITES ISSUS DE LA BIODEGRADATION DE L'ACIDE CARBAZOLE MONOSULFONIQUE

7.1. OBJECTIFS

Ce chapitre correspond à l'analyse qualitative et quantitative des milieux de culture ensemencés avec les bactéries *Proteus vulgaris* ou *Pseudomonas sp. 5* et additionnés d'acide carbazole monosulfonique comme seule source de carbone.

Ce chapitre permet :

- de montrer que plusieurs bactéries de genre différent peuvent produire des métabolites de structure indolique,
- de définir les conditions de culture favorables à la production de ces métabolites.

De plus, l'analyse quantitative permet de calculer le taux de conversion du substrat en métabolites de structure indole et de discuter les possibilités d'optimisation des conditions de culture, afin d'augmenter la production de métabolites.

7.2. PROTOCOLE

Les analyses ont été effectuées sur cinq milieux de culture, ayant un volume de cinq litres préparés dans des fermenteurs de six litres fermés et stérilisés, dont les caractéristiques sont rassemblées dans le tableau 38.

Tableau 38 : Composition des milieux de culture et origine des microorganismes testés.

Numérotation des cultures	Substrat	Concentration du substrat (g/l)	C/N/P	pH initial	Bactéries testées
12	Acide carbazole monosulfonique	5	100/20/4	6,52	<i>Proteus vulgaris</i>
13	Acide carbazole monosulfonique	5	100/20/0,1	6,39	<i>Proteus vulgaris</i>
14	Acide carbazole monosulfonique	5	100/20/4	6,25	<i>Pseudomonas sp. 5</i>
15	Acide carbazole monosulfonique	5	100/20/0,1	6,42	<i>Pseudomonas sp. 5</i>
16	Acide carbazole monosulfonique (témoin)	5	100/20/4	6,27	sans bactérie

L'agitation des milieux étant maintenue à l'aide d'un moteur BIOLAFITTE, leur oxygénation était effectuée par bullage à l'aide du compresseur du laboratoire et les prélèvements étaient effectués à l'aide d'une pompe BIOBLOCK Scientific Masterflex.

Un filtre hydrophobe GELMAN SCIENCES ACRO 50 de porosité 0,2 μm réf/4251 était placé en aval du compresseur pour stériliser l'air et adsorber les hydrocarbures.

Les milieux étaient ensemencés avec une suspension bactérienne de 200 ml provenant d'une culture dont le milieu était de composition identique (*Proteus vulgaris* souche de laboratoire ou *Pseudomonas sp.*). Cette culture âgée de sept jours était centrifugée à 4000 tours/minute pendant 20 minutes. Le culot bactérien repris dans de l'eau distillée stérile était ajouté dans le fermenteur pour conférer à l'ensemble un volume de cinq litres.

Cinq prélèvements de un litre sont effectués après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture et chaque échantillon est traité suivant la méthode présentée dans le chapitre 3.7.8.2.

L'aspect quantitatif des échantillons est effectué :

1° en pesant de manière précise à la balance METTLER 451 la fraction diméthylformamide concentrée à sec et le résidu solide de sels minéraux (cf. 3.7.8.2.) ;

2° en mesurant la concentration en hétérocycle indolique sur la fraction diméthylformamide concentrée à sec par la méthode au xanthidrol (cf. 3.7.5.) ;

3° en mesurant les concentrations en acide carbazole monosulfonique, en indole, en isatine et en acide carboxy -2 indole dans les différentes fractions diméthylformamide concentrées à sec par chromatographie HPLC (cf. 3.7.9.5.).

L'aspect qualitatif est effectué en analysant par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse (cf. 3.7.9.4.) les différentes fractions diméthylformamide concentrées à sec.

7.3. RESULTATS

Etant donné l'importance et la diversité des résultats, ce chapitre est divisé en trois parties.

La première partie correspond à un résumé des résultats de l'analyse qualitative effectuée sur chaque échantillon, la deuxième rassemble tous ces résultats, et la dernière partie présente la quantification des différentes structures indoliques identifiées.

7.3.1. ANALYSES QUALITATIVES DES ECHANTILLONS

Les analyses sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée avec un spectromètre de masse (cf. 3.7.9.4.) sur les fractions diméthylformamide concentrées à sec issues des cinq échantillons prélevés entre un et cinq jours. Ces échantillons provenaient des cultures substrat limitant (C/N/P = 100/20/4) et phosphore limitant (C/N/P = 100/20/0,1) ensemencées respectivement avec *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* (cultures n° 12, 13, 14 et 15 du tableau 38).

Les mêmes analyses sont effectuées sur leur témoin (culture n° 16 du même tableau).

Les résultats détaillés sont présentés dans les pages suivantes. Toutefois, de l'ensemble de ces résultats, on peut souligner dès maintenant les observations suivantes :

- . Trois molécules de structures indoliques ont été identifiées avec certitude.
- . Cinq autres molécules pouvant correspondre à des métabolites du carbazole semblent avoir été identifiées.
- . *Proteus vulgaris* dans les conditions C/N/P = 100/20/4 excrète des alcanes de grande taille à partir du substrat acide carbazole monosulfonique.
- . Peu d'impuretés du carbazole ont été retrouvées.
- . Différents produits secondaires de la sulfonation du carbazole ont été identifiés ainsi qu'un de leurs métabolites de dégradation.
- . De nombreuses molécules correspondant certainement à du matériel cellulaire ont été mises en évidence.

7.3.1.1. Echantillons des milieux de condition C/N/P = 100/20/4

Tous les chromatogrammes sont rassemblés en Annexe 15 (Figures 282 à 291).

Les figures 282, 283, 284, 285 et 286 représentent les chromatogrammes des phases obtenues un jour, deux jours, trois jours, quatre jours et cinq jours après ensemencement par *Proteus vulgaris*.

Les figures 287, 288, 289, 290 et 291 représentent les chromatogrammes des phases obtenues un jour, deux jours, trois jours, quatre jours et cinq jours après ensemencement par *Pseudomonas sp. 5*.

L'ensemble des molécules identifiées ou supposées est rapporté dans le tableau 39 pour les échantillons *Proteus vulgaris* et dans le tableau 40 pour les échantillons *Pseudomonas sp. 5*.

La numérotation des pics suit l'ordre d'apparition établi dans le chapitre 6.3.2.2., les pics retrouvés dans le témoin sont notés T, les pics inconnus I et les solvants et réactifs S.

Le spectre de masse, la formulation et le nom des molécules identifiées ou supposées sont présentés dans les Annexes 1, 10, 11, 12, 13, 17, 18 et 19.

Les résultats présentés ne sont pas quantitatifs, l'analyse par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse n'ayant pas été choisie dans ce but.

Cette technique a pour but d'identifier les métabolites de dégradation.

a) Culture *Proteus vulgaris*

Trente-six molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons diméthylformamide entre un et cinq jours de culture avec *Proteus vulgaris*. Le substrat est l'acide carbazole monosulfonique à la concentration de 5 g/l, les conditions C/N/P = 100/20/4. Les différentes molécules sont rassemblées dans le tableau 39.

Du tableau 39 ressortent les observations suivantes :

. Si les impuretés du carbazole (Annexe 1) ne sont pas retrouvées (sauf le méthyl-carbazole), de nouvelles impuretés dues à des réactions radicalaires secondaires de sulfonation sont observées.

Deux chlorocarbazoles sont identifiés (deux sites de substitution différents).

Il est d'ailleurs très probable qu'une des substitutions soit effectuée sur l'azote, puisqu'un seul chlorocarbazole silylé a été retrouvé.

En fait, il semble que le carbazole possède trois sites de substitution, puisque deux molécules de dichlorocarbazole ont été identifiées et une seule molécule de dichlorocarbazole silylée.

De plus, une molécule de bromocarbazole a été identifiée. Le brome correspond à une impureté de l'acide chlorosulfonique HOSO_2Cl . Il s'agit très certainement d'acide bromosulfonique HOSO_2Br , comme l'a confirmé la société PROLABO, fournisseur du réactif, dont le brome réagirait suivant une réaction de substitution électrophile sur un cycle aromatique.

. Du matériel cellulaire est retrouvé dans le milieu de culture :

- des acides gras,
- des organophosphates
- du pyrophosphate.

Tableau 39 : Présence (+) ou absence (-) des produits identifiés ou supposés dans les cinq échantillons silylés de la cultureensemencée avec *Proteus vulgaris* ; les cinq échantillons proviennent des prélèvements effectués après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture.

Nom & numérotation de la molécule		Age des échantillons (j)					Classement des spectres de masse
		1	2	3	4	5	
Carbazole	20 T	-	+	+	+	+	Annexe 1
Carbazole silylé	5 T	-	+	+	+	-	Annexe 11
Méthylcarbazole silylé	15	-	+	-	-	-	Annexe 11
Chlorocarbazole	62	+	+	+	+	+	Annexe 11
	62 bis	-	-	+	+	+	Annexe 11
Chlorocarbazole silylé	80	-	+	+	+	-	Annexe 17
Dichlorocarbazole	86	-	-	+	-	-	Annexe 17
	87	-	-	+	-	-	Annexe 17
Dichlorocarbazole silylé	88	-	-	+	-	-	Annexe 17
Bromocarbazole	78	+	+	+	-	+	Annexe 17
Antioxydant	12 T	+	+	-	-	-	Annexe 10
FO ₄ ---	61	+	+	-	+	+	Annexe 10
Acide méthylamino phosphonique	77	-	+	-	-	-	Annexe 18
Acide diméthylamino phosphonique	65	+	+	-	+	+	Annexe 18
Pyrophosphate	66	+	+	-	-	-	Annexe 18
Acide palmitique	40	+	+	+	+	-	Annexe 12
Acide stéarique	41	+	+	+	+	-	Annexe 12
Alcanes	67	+	+	-	-	+	Annexe 18
	69	+	+	-	-	+	Annexe 18
	70	+	+	-	-	+	Annexe 18
	71	+	+	+	-	+	Annexe 18
	72	+	+	+	-	+	Annexe 18
	73	+	+	+	-	+	Annexe 18
	74	+	+	+	-	+	Annexe 18
	75	+	+	+	-	+	Annexe 18
	76	+	+	+	-	+	Annexe 18
	77	-	+	-	-	-	Annexe 18
	79	-	+	-	-	-	Annexe 18
	81	-	+	-	-	-	Annexe 18
	89	-	-	+	-	-	Annexe 18
	90	-	-	+	-	-	Annexe 18
	91	-	-	+	-	+	Annexe 18
Méthylamino 1-éthyl 2-cyclohexane	82	-	-	+	-	-	Annexe 19
Ethylamino 1-éthyl 2-cyclohexane	83	-	-	+	-	-	Annexe 19
Dérivé de l'indole	85	-	-	+	-	-	Annexe 19
Dihydro carbazole dione	84	-	-	+	-	-	Annexe 19

Les acides gras et les organophosphates correspondent probablement à du matériel des enveloppes cellulaires (lyse cellulaire ...) ; quant au pyrophosphate, il est une preuve supplémentaire de l'activité physiologique des bactéries.

De nombreux alcanes sont retrouvés ($\geq C_{22}$). Ainsi, *Proteus vulgaris* utilise très probablement les atomes de carbone de l'acide carbazole monosulfonique (composé polyaromatique) pour produire des hydrocarbures linéaires de grande taille. Cette observation permet d'expliquer le fait que la concentration en hétérocycle (Figure 147) diminue considérablement le premier jour de culture, alors que la croissance bactérienne reste très faible.

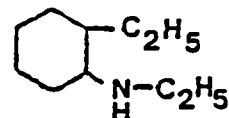
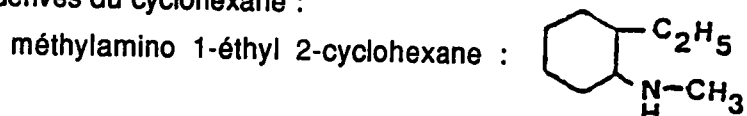
Ces mesures semblent contradictoires, mais ce n'est pas le cas, puisque la spectrométrie de masse prouve qu'il y a présence d'alcane dans le milieu de culture.

Il semble que *Proteus vulgaris* dans les conditions C/N/P = 100/20/4 biotransforme l'hétérocycle aromatique en alcanes pour ensuite les utiliser comme sources de carbone (leur disparition a été observée quatre jours après ensemencement). Il serait cependant nécessaire de confirmer cette observation en utilisant une technique au carbone marqué.

Quatre probables métabolites de la dégradation du carbazole semblent avoir été identifiés. Ces quatre composés ont été observés au troisième jour après ensemencement dans l'échantillon précédant la phase de croissance exponentielle des bactéries.

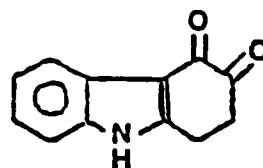
- Un dérivé probable de l'indole comme le confirme l'ordinateur du spectromètre de masse, mais dont le poids moléculaire n'a pu être confirmé.

- Deux dérivés du cyclohexane :



- Un dérivé oxydé du carbazole :

Dihydrocarbazole dione de formule brute $C_{12}H_9NO_2$.



b) Culture *Pseudomonas* sp. 5

Onze molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons diméthylformamide obtenus entre un et cinq jours de culture avec *Pseudomonas* sp. 5. Le substrat était l'acide carbazole monosulfonique à la concentration de 5 g/l, les conditions C/N/P = 100/20/4.

Les différentes molécules sont rassemblées dans le tableau 40.

Tableau 40 : Présence (+) ou absence (-) des produits identifiés ou supposés dans les cinq échantillons silylés de la cultureensemencée avec *Pseudomonas sp. 5*. Les cinq échantillons proviennent des prélèvements effectués après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture.

Nom & numérotation de la molécule	Age des échantillons (j)					Classement des spectres de masse
	1	2	3	4	5	
Carbazole 20 T	+	+	+	+	+	Annexe 1
Carbazole silylé 5 T	-	-	-	+	+	Annexe 11
Chlorocarbazole 6 2	+	+	+	+	+	Annexe 11
6 2 bis	-	+	-	-	-	Annexe 11
Dichlorocarbazole 8 6	-	+	-	-	-	Annexe 12
8 7	-	+	-	-	-	Annexe 12
Trichlorocarbazole 1 0 0	-	+	-	-	-	Annexe 17
Chlorométhyl carbazole 9 9	-	+	-	-	-	Annexe 17
Acide diméthylamino phosphonique 6 5	-	-	-	+	-	Annexe 18
Pyrophosphate 6 6	-	-	-	+	-	Annexe 18
Phosphate 6 1	+	-	+	+	+	Annexe 10

Du tableau 40 ressortent les observations suivantes :

. Les impuretés de sulfonation du carbazole (mono-, di- et trichlorocarbazole) confirment l'existence de trois sites de substitution électrophile sur le noyau carbazole et montrent les difficultés à obtenir une monosubstitution.

L'observation de chlorométhylcarbazole prouve d'ailleurs que la réaction de sulfonation n'est pas spécifique au carbazole ; elle peut s'effectuer aussi sur ses impuretés (Annexe 1).

. Peu de matériel cellulaire est retrouvé (diméthylaminophosphate et pyrophosphate). Aucun produit de dégradation du carbazole n'est identifié.

7.3.1.2. Echantillons des milieux de conditions C/N/P = 100/20/0,1

Tous les chromatogrammes sont rassemblés en Annexe 16. (Figures 292 à 301).

Les figures 292, 293, 294, 295 et 296 représentent les chromatogrammes des phases obtenues après un jour, deux jours, trois jours, quatre jours et cinq jours après ensemencement par *Proteus vulgaris*.

Les figures 297, 298, 299, 300 et 301 représentent les chromatogrammes des phases obtenues un jour, deux jours, trois jours, quatre jours et cinq jours après ensemencement par *Pseudomonas sp. 5*.

L'ensemble des molécules identifiées ou supposées est rapporté dans le tableau 41 pour les échantillons *Proteus vulgaris* et dans le tableau 42 pour les échantillons *Pseudomonas sp. 5*.

La numérotation des pics suit l'ordre d'apparition établi dans le chapitre 6.3.2.2.

Le spectre de masse, la formulation et le nom des molécules identifiées ou supposées sont présentés dans les annexes 1, 10, 11, 12, 13, 17, 18 et 19.

a) Culture *Proteus vulgaris*

Quinze molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons diméthylformamide obtenus entre un et cinq jours de culture avec *Proteus vulgaris*. Le substrat était l'acide carbazole monosulfonique à la concentration de 5 g/l et les conditions C/N/P = 100/20/0,1.

Les différentes molécules sont rassemblées dans le tableau 41.

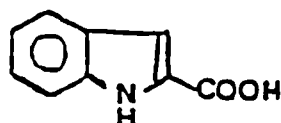
Tableau 41 : Présence (+) ou absence (-) des produits identifiés ou supposés dans les cinq échantillons silylés de la culture ensemencée avec *Proteus vulgaris* ; les cinq échantillons proviennent des prélèvements effectués après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture.

Nom & numérotation de la molécule	Age des échantillons (j)					Classement des spectres de masse
	1	2	3	4	5	
Carbazole 20 T	+	+	+	+	+	Annexe 1
Carbazole silylé 5 T	-	-	+	+	+	Annexe 11
Chlorocarbazole 6 2	-	+	+	+	+	Annexe 11
Chlorocarbazole silylé 8 0	-	-	-	+	+	Annexe 17
PO ₄ ³⁻ 6 1	+	+	+	+	+	Annexe 10
Acide diméthylamino phosphonique 6 5	-	+	-	-	-	Annexe 18
Méthylcarbazole 2 3	-	+	-	-	-	Annexe 1
Acide palmitique 4 0	-	-	-	+	+	Annexe 12
Acide stéarique 4 1	-	-	-	+	+	Annexe 12
Osé 9 2	+	-	-	-	-	Annexe 12
Polycyclohexane 9 3	+	-	-	-	-	Annexe 18
Polycyclohexane 9 4	+	-	-	-	-	Annexe 18
Acide carboxy-2 indole 9 8	-	+	+	+	-	Annexe 19
Indole 9 6	-	-	+	+	-	Annexe 19
Chloroindole 9 7	-	-	+	-	-	Annexe 19

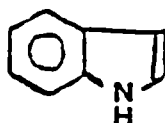
Du tableau 41 ressortent les observations suivantes :

- . Présence comme dans les autres réacteurs d'impuretés de sulfonation.
- . Présence de matériel cellulaire : diméthylaminophosphate et acides gras déjà observés dans le milieu de culture de conditions C/N/P = 100/20/4. Une trace de sucre est observée le premier jour, ainsi que deux composés de types polycyclohexane.
- . Contrairement au milieu de conditions C/N/P = 100/20/4, la présence d'alcane n'est pas observée. Par contre, des métabolites de dégradation du carbazole sont identifiés.

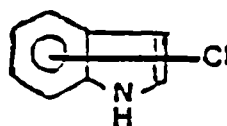
Acide carboxy - 2 indole



Indole



Chloroindole



L'acide carboxy - 2 indole et l'indole ont été comparés avec des étalons (Annexe 12) ; leurs spectres et temps de rétention sont très similaires.

Le composé chloroindole présente d'importantes similitudes, d'un point de vue spectre de masse, avec celui de l'indole et prouve par là-même que les impuretés de sulfonation peuvent être dégradées par *Proteus vulgaris*.

Les conditions de culture en phosphore carencé inhibent la production d'alcane chez *Proteus vulgaris* et favorisent la production d'indole et dérivés.

b) Culture de *Pseudomonas* sp. 5

Dix molécules, dont la structure est identifiée ou supposée, ont été mises en évidence dans les cinq échantillons diméthylformamide obtenus entre un et cinq jours de culture avec *Pseudo-*

monas sp. 5. Le substrat était l'acide carbazole monosulfonique à la concentration de 5 g/l et les conditions C/N/P = 100/20/0,1.

Les différentes molécules sont rassemblées dans le tableau 42.

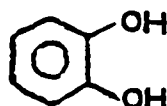
Tableau 42 : Présence (+) ou absence (-) des produits identifiés ou supposés dans les cinq échantillons silylés de la culture ensemencée par *Pseudomonas sp. 5*. Les cinq échantillons correspondent aux prélèvements effectués après 1, 2, 3, 4 et 5 jours de culture.

Nom & numérotation de la molécule	Age des échantillons (j)					Classement des spectres de masse
	1	2	3	4	5	
Carbazole 20 T	+	+	+	+	+	Annexe 1
Carbazole silylé 5 T	-	+	-	-	-	Annexe 11
Chlorocarbazole 62	+	+	+	+	+	Annexe 11
62 bis	+	-	-	-	-	Annexe 11
Chlorocarbazole silylé 80	-	+	-	-	-	Annexe 17
Antioxydant 12 T	-	+	+	+	-	Annexe 10
Catéchol 101	-	+	+	+	-	Annexe 19
Isatine 102	-	-	+	-	-	Annexe 19
Matériel cellulaire carboxylé C > 20	-	-	-	+	+	Annexe 12
103	-	-	-	-	+	Annexe 18
PO 61	-	+	-	-	-	Annexe 10

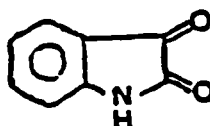
Du tableau 42 ressortent les observations suivantes :

- Présence des impuretés de sulfonation.
- Peu de matériel cellulaire est observé, à part dans l'échantillon âgé de cinq jours dans lequel un composé carboxylé complexe (C > 20) est observé.
- Par contre, et contrairement au milieu de conditions C/N/P = 100/20/4, deux produits de dégradation du carbazole sont observés :

1) le catéchol



2) l'isatine



Ces deux composés ont été comparés avec des étalons (Annexe 12) ; leurs spectres et temps de rétention sont tout à fait similaires.

Comme pour *Proteus vulgaris*, les conditions de culture en phosphore carencé favorisent la production de métabolites.

Ces deux composés sont les seuls métabolites correspondant au schéma de dégradation théorique (Figure 63) qui avait été proposé dans la partie bibliographique.

Il semble que la bactérie ait quelques difficultés à consommer les composés de type 1,2 diol ou 1,2 dione.

7.3.2. ANALYSES QUANTITATIVES DES ECHANTILLONS

7.3.2.1. Extrait au diméthylformamide

Les quantités de matière organique solubles dans les milieux de culture ont été mesurées par pesée de la fraction soluble dans le diméthylformamide (traitement rapporté dans le chapitre 3.7.8.2.).

Ces mesures ont été effectuées sur les différents échantillons correspondant aux prélèvements accomplis après un, deux, trois, quatre et cinq jours de culture avec *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* dans les conditions C/N/P = 100/20/4 et 100/20/0,1.

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 43 et 44 pour respectivement *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5*.

Tableau 43 : Evolution des quantités extraites (en grammes) avec le diméthylformamide, après passage sur la résine DUOLITE A378 et lyophilisation des échantillons prélevés dans les culturesensemencées avec *Proteus vulgaris*, en fonction de l'âge des cultures.

C/N/P Age de la culture (j)	100/20/4	100/20/0,1
1	1,57	2,06
2	2,77	2,24
3	2,01	2,9
4	1,85	2,22
5	2,65	0,98

Tableau 44 : Evolution des quantités extraites (en grammes) avec le diméthylformamide, après passage sur résine et lyophilisation des échantillons prélevés dans les cultures ensemencées avec *Pseudomonas*, en fonction de l'âge des cultures.

C/N/P Age de la culture (j)	100/20/4	100/20/0,1
1	1,87	2,41
2	2,71	2,27
3	4,37	2,61
4	3,69	2,42
5	3,81	4,34

La masse des extraits DMF des cultures de *Proteus vulgaris* restent, en fonction de l'âge et quel que soit le milieu de culture, du même ordre de grandeur ($2,3 \pm 0,4$ g).

Les résultats obtenus avec les cultures ensemencées avec *Pseudomonas sp. 5* sont plus variés :

- Dans le milieu C/N/P = 100/20/0,1 les extraits restent stables les quatre premiers jours ($2,4 \pm 0,2$ g) pour pratiquement doubler le cinquième jour.

- Dans le milieu C/N/P = 100/20/4 ils augmentent les trois premiers jours pour ensuite se maintenir constants ($1,0 \pm 0,3$ g).

7.3.2.2. Evolution de la concentration en hétérocycles désorbés après passage sur résine DUOLITE A378, lyophilisés et extraits au DMF

Les concentrations en hétérocycles des extraits au DMF ont été mesurées par la méthode au xanthidrol et ont permis d'établir le pourcentage d'hétérocycles dans les extraits (Tableaux 45 et 46 pour *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* respectivement).

Tableau 45 : Pourcentage d'hétérocycles dans les extraits au DMF après passage des échantillons dans la résine DUOLITE A378 et lyophilisation des cultures ensemencées avec *Proteus vulgaris*.

C/N/P Age des échantillons (j)	100/20/4		100/20/0,1	
	Concentration en hétérocycles (mg/l)	% par rapport à l'extrait DMF	concentration en hétérocycles (mg/l)	% par rapport à l'extrait DMF
1	280 $\pm$ 20	18 $\pm$ 1	990 $\pm$ 20	48 $\pm$ 1
2	690 $\pm$ 60	25 $\pm$ 2	1140 $\pm$ 40	51 $\pm$ 2
3	660 $\pm$ 20	33 $\pm$ 1	720 $\pm$ 60	25 $\pm$ 2
4	1050 $\pm$ 20	57 $\pm$ 1	580 $\pm$ 10	26,2 $\pm$ 0,5
5	820 $\pm$ 30	31 $\pm$ 1	284 $\pm$ 5	29,0 $\pm$ 0,5

Tableau 46 : Pourcentage d'hétérocycles dans les extraits au DMF après passage des échantillons dans la résine DUOLITE A378 et lyophilisation des culturesensemencées avec *Pseudomonas sp. 5*.

C/N/P	100/20/4		100/20/0,1	
Age des échantillons (i)	Concentration en hétérocycles (mg/l)	% par rapport à l'extrait DMF	concentration en hétérocycles (mg/l)	% par rapport à l'extrait DMF
1	520 ± 40	28 ± 2	260 ± 20	10,6 ± 0,9
2	119 ± 8	4,4 ± 0,3	230 ± 20	10 ± 1
3	14 ± 1	0,33 ± 0,03	550 ± 50	21 ± 2
4	360 ± 30	9,8 ± 0,9	310 ± 20	13 ± 1
5	460 ± 40	12 ± 1	150 ± 20	3,5 ± 0,5

La résine DUOLITE A378 semble présenter une adsorption plus efficace avec les échantillons des culturesensemencées avec *Pseudomonas sp. 5*.

Pour confirmer cette observation, les concentrations en acide carbazole monosulfonique ont été mesurées sur ces mêmes extraits.

La capacité d'adsorption de la résine en g/l pour chaque échantillon a été calculée en comparant les concentrations en acide sulfonique avant et après leur passage à travers la résine (Annexe 14).

Les capacités moyennes de la résine en g/l pour chaque milieu de culture sont rapportées dans le tableau 47.

Tableau 47 : Capacités moyennes d'adsorption de la résine DUOLITE A378 (eq./l) de l'acide carbazole monosulfonique pour les différents milieux de culture testés.

Bactéries testées	C/N/P testés	Capacité moyenne d'adsorption de la résine (eq./l)
<i>Proteus vulgaris</i>	100/20/4	0,59 ± 0,05
<i>Proteus vulgaris</i>	100/20/0,1	0,58 ± 0,04
<i>Pseudomonas sp.5</i>	100/20/4	0,66 ± 0,02
<i>Pseudomonas sp.5</i>	100/20/0,1	0,65 ± 0,03

Le tableau 47 montre que :

- La capacité moyenne d'adsorption de la résine est indépendante de la quantité de phosphate apportée aux milieux de culture (les valeurs obtenues sont semblables pour chaque bactérie testée quelle que soit la concentration en phosphate).

- La résine DUOLITE A378 est plus efficace avec les milieuxensemencés avec *Pseudomonas sp.* 5. Cela signifie que les milieux de cultureensemencés avec *Proteus vulgaris* sont plus riches en molécules autres que l'acide sulfonique, ces molécules interférant sur l'adsorption de l'acide. Cette constatation semble d'ailleurs en accord avec les analyses qualitatives effectuées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Annexes 15 et 16) (présence de nombreux alcanes et produits de dégradation de l'acide carbazole monosulfonique).

- Dans tous les cas, la capacité d'adsorption de la résine est moindre que celle de l'échantillon d'acide carbazole monosulfonique pur (0,709 eq./l ; Annexe 2B) et du témoin sans bactéries des quatre cultures testées ($0,69 \pm 0,01$ eq./l).

Cela signifie que non seulement les sels minéraux ajoutés dans les milieux influent sur l'adsorption de l'acide sulfonique, mais aussi les molécules produites par les bactéries.

Dans ces conditions, des molécules ont sans doute été retenues lors de la filtration sur résines. Aussi les résultats, sûrement sous-estimés, doivent être considérés avec prudence.

7.3.2.3. Concentrations en indole et en dérivés de l'indole dans les extraits au DMF

Dans les échantillons analysés qualitativement (cf. 7.3.1.), ont été identifiés trois métabolites ayant une structure indolique : indole, acide indole carboxylique et isatine.

Leur dosage quantitatif a été effectué par HPLC (cf. 3.7.9.5.2.) et non pas par la méthode au xanthidrol puisqu'il s'agit d'une méthode qui ne permet pas de doser tous les dérivés indoliques (cf. Isatine dans le chapitre 3.7.5.).

Les concentrations des différents composés identifiés sont rapportées dans le tableau 48.

Tableau 48 : Evolution des concentrations en indole, en acide indole carboxylique et en isatine en fonction de l'âge des cultures étudiées.

Age de la culture testée (j)	Micro-organisme testé	Conditions C/N/P	Nom de l'hétérocycle indolique	Concentration en mg/l	Production par rapport à la concentration initiale en acide sulfonique (%)	
2	<i>Proteus vulgaris</i>	100/20/0,1	Acide indole carboxylique	27 ± 2	0,54 ± 0,04	
3				46 ± 5	0,9 ± 0,1	
4				110 ± 10	2,2 ± 0,2	
3				58 ± 2	1,16 ± 0,04	
4	Indole			55 ± 4	1,10 ± 0,08	
3	<i>Pseudomonas sp. 5</i>				46 ± 1	0,92 ± 0,02
4				Isatine	40 ± 2	0.80 ± 0.04

Le tableau 48 montre que *Proteus vulgaris* présente les résultats les plus intéressants dans notre étude, puisque :

. *Proteus vulgaris* est la seule bactérie à produire de l'indole. Dans les conditions C/N/P = 100/20/0,1 le fermenteur contenait, entre le troisième et le quatrième jour de culture, 57 ± 3 mg/l d'Indole.

. Le fermenteurensemencé avec *Proteus vulgaris* contient dans les mêmes conditions de culture, une quantité plus importante de composés indoliques (jusqu'à $3,3 \pm 0,3\%$ par rapport à la concentration initiale en acide carbazole monosulfonique) que le fermenteurensemencé avec *Pseudomonas sp. 5* (jusqu'à $0,92 \pm 0,02\%$).

De toutes les bactéries testées, *Proteus vulgaris* correspond au microorganisme qui permet d'approcher le mieux du but que nous nous étions proposé.

7.4. DISCUSSION

L'analyse en spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence de nombreux produits dont l'indole et deux de ses dérivés.

Ce chapitre discute de la provenance des différents produits de dégradation identifiés.

7.4.1. DEGRADATION DES MOLECULES PRESENTES DANS LES MILIEUX DE CULTURE

Les bilans (cf. 5.3.2.2.c.) ont montré que l'acide carbazole monosulfonique était utilisé comme substrat par *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5* quelles que soient les conditions de culture.

Cependant, comme l'étude chromatographique l'a montré, l'acide carbazole monosulfonique n'a pas été la seule source de carbone consommée par les bactéries. Les autres substrats utilisés sont les produits secondaires de la réaction de sulfonation (chlorocarbazole et bromocarbazole) ainsi que des résidus n'ayant pas réagi lors de la sulfonation (carbazole et méthylcarbazole).

En effet, l'expérimentation ayant montré que l'acide carbazole monosulfonique était utilisé comme substrat par les bactéries *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp. 5*, il est probable qu'il en est de même avec le carbazole et les dérivés cités ci-dessus.

7.4.2. LES PRODUITS DE DEGRADATION

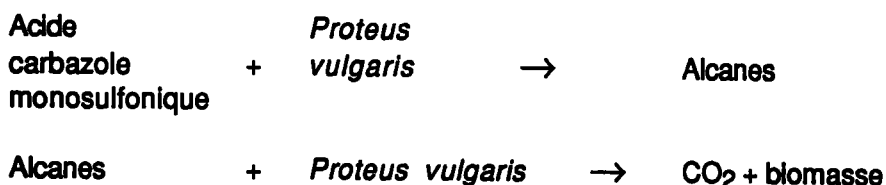
Les produits de dégradation qui ont été identifiés sont nombreux, mais leur formulation est très différente suivant que les conditions de culture sont carbone limitant (C/N/P = 100/20/4) ou phosphore limitant (C/N/P = 100/20/0,1).

Ce chapitre est donc traité en deux parties, et ceci en fonction des conditions de culture.

7.4.2.1. Conditions de carence en carbone

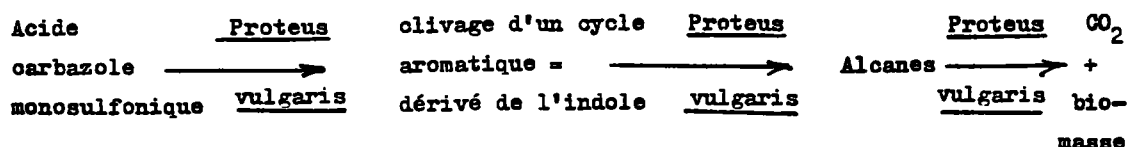
Dans les conditions de carence en carbone (C/N/P = 100/20/4), *Proteus vulgaris* produit jusqu'à quinze alcanes de grande taille ($C \geq 22$) pour ensuite les consommer comme substrat.

Le schéma de dégradation de l'acide carbazole monosulfonique peut se résumer de la manière suivante (il serait cependant bon de le confirmer par une technique de radioactivité utilisant l'acide carbazole monosulfonique marqué) :



Cependant, un dérivé de l'indole (Molécule n° 85 de poids moléculaire non défini) semble avoir été identifié le troisième jour de la culture. Cette observation semble montrer que la bactérie effectue le clivage d'un des cycles aromatiques comme le font observer les travaux sur la dégradation de l'acide paratoluène sulfonique avec *Pseudomonas* (Focht & Williams, 1970) et de l'acide 2 - naphthalène sulfonique avec *Pseudomonas sp. C22* (Brilon *et al.*, 1981b).

Le schéma proposé ci-dessus peut être complété de la façon suivante :



La molécule dihydrocarbazole dione qui semble avoir été identifiée le troisième jour de culture peut confirmer le fait que *Proteus vulgaris* débute la dégradation du noyau carbazole par une dihydroxylation (cf. 2.3.3.1.). Cette dihydroxylation serait suivie d'une oxydation en cétone et d'une hydrogénation.

L'hydrogénation observée peut être due à une oxygénation insuffisante du milieu de culture et confirmerait ainsi l'observation de deux dérivés du cyclohexane (Molécules n° 82 et 83).

La dégradation débute par l'oxydation d'un des cycles aromatiques du carbazole (avec élimination du substituant sulfonate) et se poursuit par les clivages successifs du cycle aromatique substitué et de l'hétérocycle.

Le substrat est ensuite utilisé pour former des alcanes qui sont ensuite assimilés par les bactéries, après oxydation en acide gras, par β -oxydation (cf. 3.1.1.1.).

Dans les conditions de carence en carbone (C/N/P = 100/20/4), *Pseudomonas sp. 5* ne produit apparemment pas ou peu de métabolites de dégradation, même si le chapitre 5.3.2.2.c. a montré que l'acide carbazole monosulfonique était dégradé.

De ce fait, aucun mécanisme de dégradation n'est proposé.

7.4.2.2. Conditions de carence en phosphore

Dans les conditions de carence en phosphore (C/N/P = 100/20/0,1), *Proteus vulgaris* ne produit plus d'alcanes, mais de l'indole et de l'acide carboxy 2 - indole. Par ailleurs, a été aussi retrouvé du chloroindole qui correspond très certainement à la dégradation du chlorocarbazole, produit secondaire de sulfonation.

Le cycle aromatique chloré est conservé puisque peu de bactéries peuvent utiliser les composés xénobiotiques chlorés (Steiert & Crawford, 1985) ; par contre, le second cycle aromatique a été dégradé.

Quant aux composés ayant une structure polycyclohexane, leur origine est difficile à expliquer, ils pourraient correspondre à des produits de dégradation du noyau carbazole.

Les mécanismes de dégradation de l'acide carbazole monosulfonique et du chlorocarbazole sont représentés sur la figure 171.

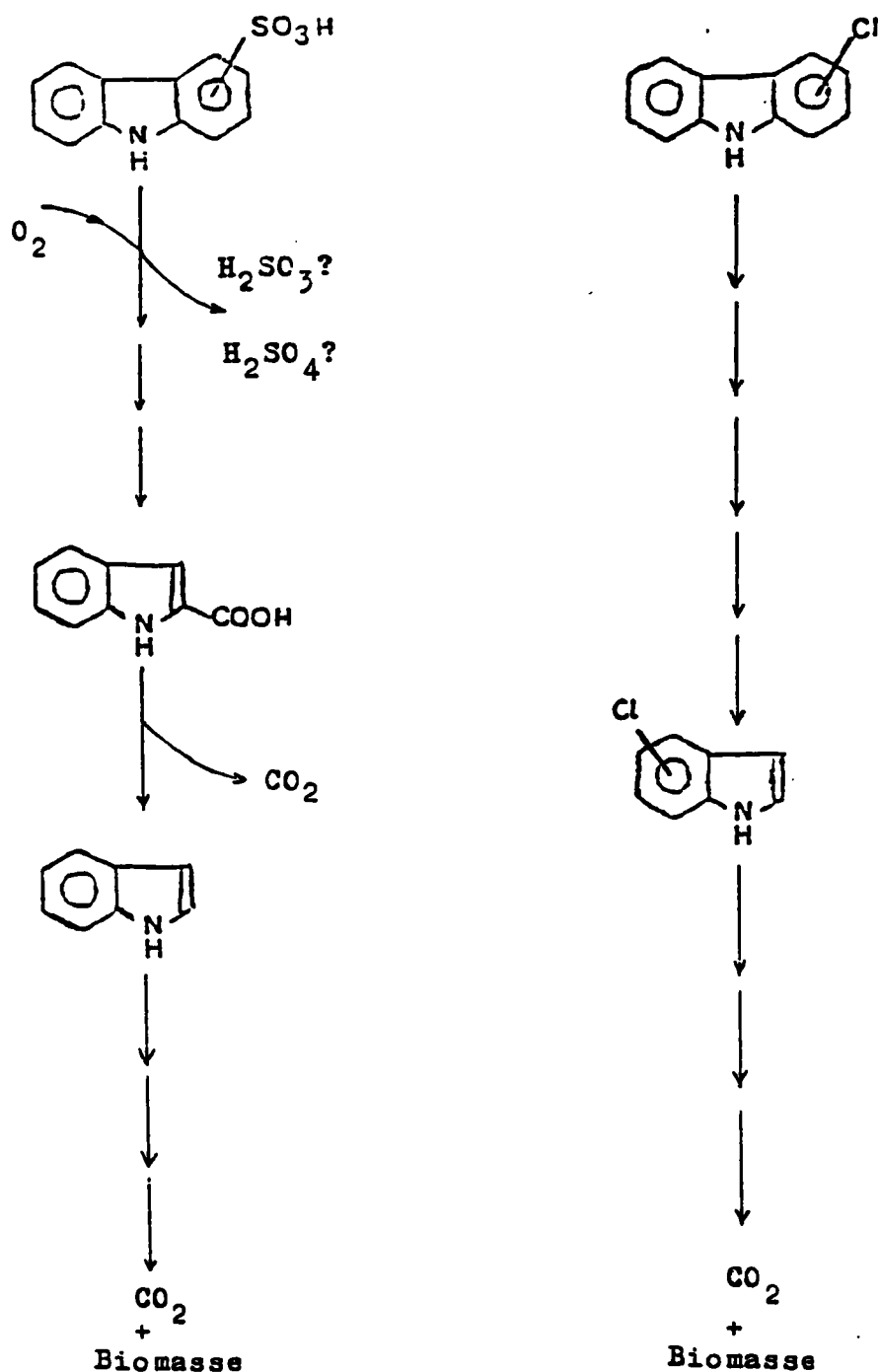


Figure 171 : Proposition d'un mécanisme de dégradation de l'acide carbazole monosulfonique et du chlorocarbazole par *Proteus vulgaris* dans les conditions C/N/P = 100/20/0,1.

La figure 171 montre que le cycle aromatique substitué est dégradé dans le cas de l'acide carbazole monosulfonique. Cette observation est tout à fait en accord avec les travaux de Cain & Farr (1968), Bird & Cain (1974), Endo *et al.* (1977), Brilon *et al.* (1981a et 1981b), et avec les prévisions de dégradation des acides carbazole monosulfoniques présentées dans le chapitre 2.7.3.3.

Cependant l'acide carboxy - 2 - indole et l'indole n'avaient pas été prévus dans ces mécanismes hypothétiques.

De ce fait, soit les mécanismes proposés dans le chapitre 2.7.3.3. sont inexacts, soit les deux métabolites sont la preuve d'une activité enzymatique non encore étudiée dans le cadre de la dégradation des hydrocarbures.

Quant à *Pseudomonas sp.* 5, dans les conditions de carence en phosphore (C/N/P = 100/20/0,1), la production d'isatine et de catéchol a été observée (Figure 172). Ces deux produits de dégradation étaient prévus dans les mécanismes hypothétiques de dégradation des acides carbazole monosulfoniques du chapitre 2.7.3.3.

Les mécanismes hypothétiques semblent correspondre au mécanisme de dégradation du substrat par *Pseudomonas sp.* 5. Cela ne signifie pas pour autant que les mécanismes soient les mêmes pour *Proteus vulgaris*.

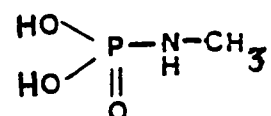
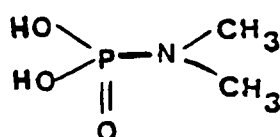
En effet, les mécanismes peuvent être très variés et dépendent de la richesse de l'équipement enzymatique des bactéries testées et de son expression.

7.4.3. LE MATERIEL CELLULAIRE

. Deux acides gras (l'acide palmitique et l'acide stéarique) ont été détectés dans les culturesensemencées avec *Proteus vulgaris* et proviennent probablement de la lyse cellulaire. Leur propriété tensioactive n'a pas d'utilité pour cette étude ; par contre, ils peuvent être utilisés comme substrat par les bactéries et assimilés par β -oxydation (Atlas, 1981).

. Deux dérivés de l'acide phosphonique ont été identifiés dans les culturesensemencées avec *Proteus vulgaris* et un seul dans la culture (C/N/P = 100/20/4)ensemencée avec *Pseudomonas sp.* 5.

Leur formulation est la suivante :



Ces composés peuvent avoir été formés par les bactéries par réaction de phosphorylation avec la diméthylamine et la méthylamine, ces deux molécules pouvant provenir de la dégra-

ation de l'hétérocycle du carbazole. Cependant, l'intérêt de ces deux molécules pour la bactérie reste obscur.

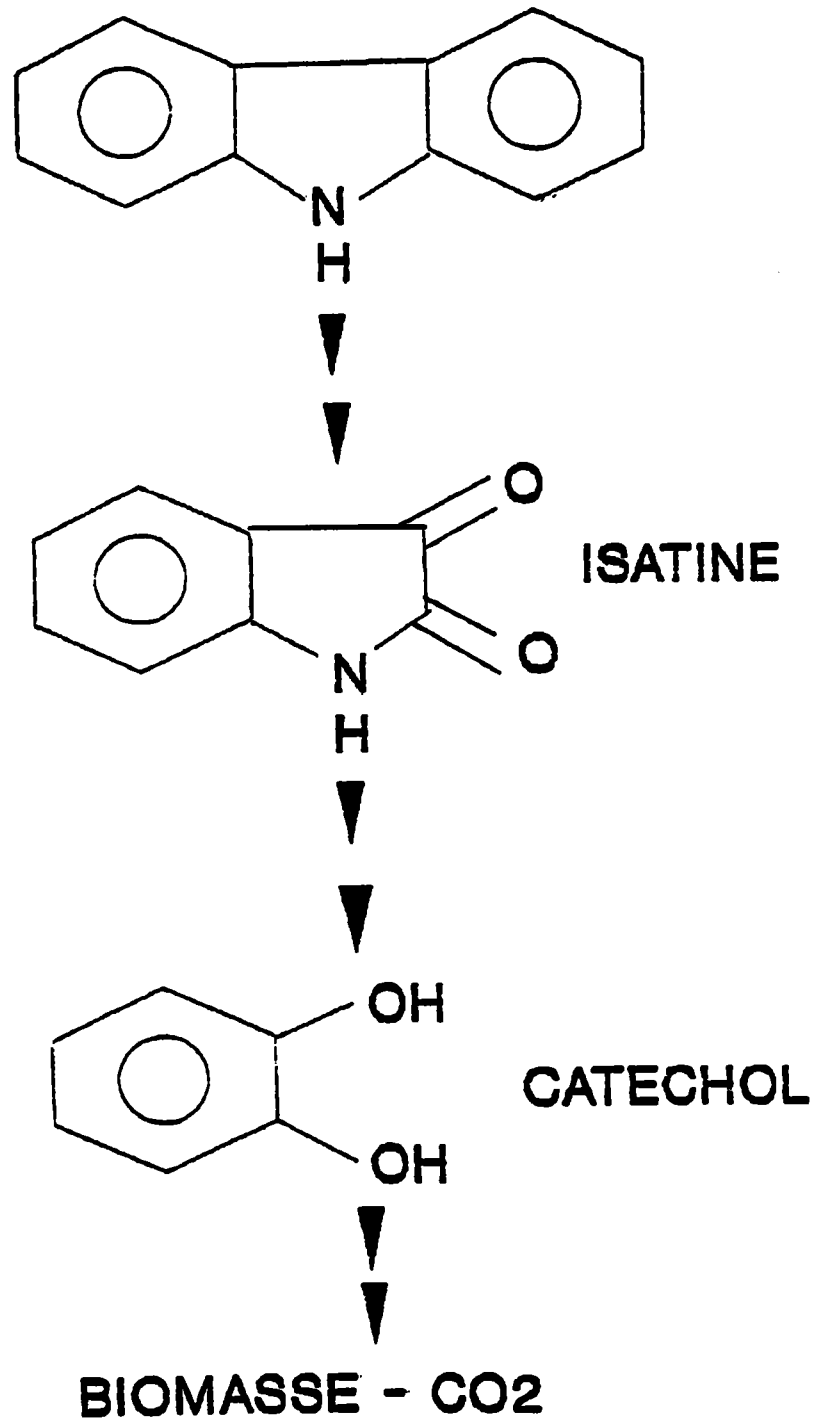


Figure 172 : Dégradation du carbazole par *Pseudomonas* sp. 5 (C/N/P = 100/20/0,1).

. Des traces de sucre ont été retrouvées après une journée de culture avec *Proteus vulgaris* dans les conditions C/N/P = 100/20/0,1.

. Par contre, une molécule de grande taille (C > 20) probablement carboxylée, a été retrouvée en concentration élevée après cinq jours de culture dans les conditions C/N/P = 100/20/0,1 avec *Pseudomonas sp. 5*.

Cette étude montre, en définitive, qu'il est possible d'obtenir des composés indoliques, et même de l'indole, lors de la dégradation de l'acide carbazole monosulfonique.

Les conditions testées les plus favorables à la production de métabolites indoliques sont les suivantes :

- **substrat** : acide carbazole monosulfonique,
- **conditions de milieu** : C/N/P = 100/20/0,1,
- **bactérie** : *Proteus vulgaris*.

8. CONCLUSION

Il est connu que de nombreuses bactéries sont capables d'utiliser certaines molécules d'origine industrielle comme source de carbone et d'énergie pour leur synthèse cellulaire. Sur ce principe, nous avons décidé d'étudier la biodégradation du 9H-Carbazole.

Il a donc été nécessaire :

1) de sélectionner les genres bactériens capables d'utiliser le carbazole comme source de carbone ;

2) de déterminer la forme la plus biodisponible et la plus favorable à la biodégradation, et nous avons pour cela choisi d'étudier :

- le carbazole seul,
- le carbazole en présence de tensioactifs de synthèse (P94 et P103 copolymères d'oxyde d'éthylène et de propylène),
- l'acide carbazole monosulfonique, obtenu par réaction chimique entre le carbazole et l'acide chlorosulfonique.

Ces trois directions ont été choisies pour les variations de solubilité du carbazole dans l'eau. En effet, il présente seul une solubilité inférieure à 1 mg/l tandis qu'en présence des tensioactifs P94 et P103, il peut atteindre 10 mg/l et dépasser les 100 g/l sous sa forme acide sulfonique.

3) d'étudier la dynamique des cultures bactériennes sur le carbazole en fonction du temps.

Cette étude a ainsi montré que les acteurs de la biodégradation du carbazole sont indifféremment Gram positive et Gram négative, même si les genres *Flavobacterium*, *Kurthia* et *Pseudomonas* prédominent.

En fait, l'activité de certaines bactéries a été étudiée de manière plus approfondie et a montré que :

- le carbazole seul est faiblement biodégradable ; sa biodégradation a été montrée par :
 - 1) les variations du pH des cultures en fonction du temps, variations significatives d'une activité bactérienne ou/et d'une production de métabolites extracellulaires,
 - 2) l'augmentation des populations bactériennes en fonction du temps,
 - 3) les variations de la composition de la phase soluble des milieux de culture

- le carbazole en présence des tensioactifs P94 et P103 présente une meilleure biodégradabilité qui se caractérise par :

- 1) une consommation comprise entre 2 et 6% de carbazole pour les bactéries *Agrobacterium sp 2*, *Corynebacterium sp 3* et leur mélange après 8 jours d'incubation dans des conditions de carbone, d'azote et de phosphore non limitantes (C/N/P = 100/5/1),
- 2) dans ces mêmes conditions, les taux de croissance μ des bactéries, citées ci-dessus, varient entre 0,7 et 2,3 j⁻¹

- le carbazole sous sa forme acide carbazole sulfonique présente la meilleure biodégradabilité puisque

- 1) la consommation est comprise entre 17 et 50% pour les bactéries *Pseudomonas sp 5* et *Proteus vulgaris* après 5 jours d'incubation et dans les conditions de carbone limitant (C/N/P = 100/20/4) et de phosphore limitant (C/N/P = 100/20/0,1),
- 2) dans ces mêmes conditions, les taux de croissance μ des deux bactéries citées ci-dessus varient entre 2,2 et 5,2 j⁻¹.

Les milieux de culture présentant les conditions les plus favorables à la dégradation sont retenus pour une analyse qualitative des métabolites extracellulaires produits par les bactéries testées.

Les premiers milieux qui ont été étudiés étaient constitués du carbazole en présence des tensioactifs P94 et P103. Les milieux de culture étant très complexes, il fallut réaliser diverses extractions afin d'obtenir plusieurs phases susceptibles d'être facilement analysées par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse.

Ces différentes étapes furent de :

- éliminer par centrifugation et filtration le carbazole insoluble dans l'eau et les bactéries,
- extraire après lyophilisation de la phase soluble les molécules hydrophobes avec le dichlorométhane,

- extraire ensuite les molécules hydrophiles avec le diméthylformamide, ces deux solvants (CH_2Cl_2 et DMF) permettant d'éliminer les sels minéraux des extraits.

Les analyses qualitatives ont été menées sur les extraits de cultures ensemencées avec *Agrobacterium sp 2*, *Corynebacterium sp 3* et leur mélange, dans les conditions favorables à la croissance de C/N/P = 100/5/1.

Les spectres de masse obtenus ont été utilisés comme instrument de travail et ont permis de mettre en place des hypothèses.

Ils ont permis de retrouver :

- le carbazole,
- les impuretés du carbazole (anthracène, phénanthrène, méthylphénanthrène, méthylcarbazole, pyrène et fluoranthène),
- des molécules d'origine bactérienne (acides palmitique et stéarique, polyols, sucres neutres et acides uroniques, glycérophosphorylglycérol),
- des fragments plus ou moins dégradés des tensioactifs P94 et P103, ce qui indique que ceux-ci peuvent servir de source de carbone,
- des dérivés de dégradation des impuretés du carbazole (hydroxyméthylcarbazole, anthracène dione ou phénanthrène dione),
- ainsi que de possibles dérivés de dégradation du carbazole (méthylamino-cyclohexadiène et formyl 1-méthylamino-2-cyclohexane).

L'ensemble de ces manipulations n'a pas permis de mettre en évidence un mécanisme de dégradation du carbazole. Cependant, les essais menés avec l'acide carbazole monosulfonique ont fourni des résultats plus intéressants.

Néanmoins il fallut, là-aussi, réaliser diverses opérations pour obtenir plusieurs phases susceptibles d'être facilement analysées par couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse.

Trois étapes furent nécessaires :

- éliminer par filtration les bactéries,
- éliminer l'acide carbazole monosulfonique non biodégradé, par passage sur résine échangeuse d'ions,
- extraire au diméthylformamide les molécules hydrophiles afin d'éliminer les sels minéraux.

Les analyses qualitatives ont été menées sur les extraits de cultures ensemencées avec *Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp 5* dans les conditions de carbone limitant (C/N/P = 100/20/4) et de phosphore limitant (C/N/P = 100/20/0,1).

Les spectres de masse obtenus ont permis d'établir des hypothèses de travail qui ont permis de retrouver dans tous les cas :

- des traces de carbazole,
- des impuretés du carbazole (anthracène, phénanthrène, méthylanthracène, méthylphénanthrène, méthylcarbazole, pyrène, fluoranthène),
- quelques sous-produits de la sulfonation (mono-, di-, tri-chlorocarbazole, bromocarbazole),
- des molécules d'origine bactérienne (acides gras, ose neutre, pyrophosphate, acide phosphonique),
- un dérivé de dégradation de sous-produits de la sulfonation a été retrouvé avec *Proteus vulgaris* (C/N/P = 100/20/0,1) : chloroindole.

Plus précisément et dans les conditions de carbone limitant C/N/P = 100/20/4, la biodégradation de l'acide carbazole monosulfonique par *Proteus vulgaris* se caractérise par la production d'alcane linéaires à longue chaîne carbonée, qui sont ensuite totalement dégradés.

La biodégradation de l'acide sulfonique par *Pseudomonas sp 5*, dans les mêmes conditions, n'a pas permis de déterminer le moindre métabolite extracellulaire.

L'étude de ces deux milieux de culture, de caractéristique carbone limitant, a montré que :

- la croissance bactérienne est importante,
- la dégradation de l'acide carbazole monosulfonique aboutit à l'assimilation totale de la molécule, avec une production faible ou nulle de métabolites extracellulaires.

Dans les conditions phosphore limitant et pour ces deux mêmes bactéries (*Proteus vulgaris* et *Pseudomonas sp 5*), les résultats sont tout à fait différents. En effet, la croissance bactérienne est plus faible que dans le cas précédent, mais ces milieux semblent favoriser la production extracellulaire puisque :

- la biodégradation de l'acide carbazole monosulfonique par *Proteus vulgaris* aboutit à la production extracellulaire de l'acide indole-2-carboxylique et d'indole,
- la biodégradation de l'acide carbazole monosulfonique par *Pseudomonas sp 5* aboutit à la production extracellulaire d'isatine et de catéchol.

En définitive, dans cette étude, les conditions testées les plus favorables à la production de métabolites indoliques sont les suivantes :

- **substrat = acide carbazole monosulfonique**
- **conditions de milieux : C/N/P = 100/20/0,1**
- **bactérie : *Proteus vulgaris*.**

Il est cependant dommage que les rendements obtenus interdisent à l'heure actuelle une exploitation industrielle. En effet, ils dépassent rarement 1% pour l'indole et l'acide indole-2-carboxylique. Cependant, il reste encore à optimiser de nombreux paramètres et à réaliser un bioréacteur adéquat.

9. BIBLIOGRAPHIE

AKHTAR M.N., D.R. BOYD, N.J. THOMPSON, M. KOREEDA, D.T. GIBSON, V. MAHADEVAN & D.M. JERINA, 1975,
Absolute stereochemistry of the dehydroanthracene - cis - and - trans - 1,2 - diols produced from anthracene by mammals and bacteria,
J. Chem. Soc. (Perkin), 1, 2506-2511.

ANDERSON G.M. & W.C. PURDY, 1979,
Liquid chromatographic-fluorometric system for the determination of indoles in physiological samples,
Anal. Chem., 51 (2), 283-286.

ANDERSON M.S., R.A. HALL & M. GRIFFIN, 1980,
Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons :Cyclohexane catabolism by a pure strain of Pseudomonas sp.,
J. Gen. Microbiol., 120, 89 - 94.

AOKI K., R. SHINKE & H. NISHIRA, 1983,
Metabolism of aniline by Rhodococcus erythropolis AN - 13,
Agr. Biol. Chem., 47 (7), 1611 - 1616.

ARIMA K., A. KAKINUMA & G. TAMURA, 1968,
Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by Bacillus subtilis: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 31 (3), 488 - 494.

ASSELINEAU C. AND J. ASSELINEAU, 1978,
Trehalose - containing glycolipids,
Prog. Chem. Fats other Lipids, 16, 59-99.

ATLAS R.M., 1975,
Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation,
Appl. Microbiol., 30 (3), 396 - 403.

ATLAS R.M., 1981,
Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective,
Microbial. Rev., 45 (1), 180 - 209.

ATLAS R.M. & R. BARTHA, 1972,
Degradation and mineralization of petroleum in sea water: Limitation by nitrogen and phosphorous,
Biotechnol. bioeng., 14, 309 - 318.

AURET B.J., S.K. BALANI, D.R. BOYD, R.M.E. GREENE & G.A. BERCHTOLD, 1984,
Regioselective dihydroarene oxide formation during ortho-hydroxylation of halogenobenzenes by fungi,
J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 2659 - 2664.

AUSTIN B., J.J. CALOMIRIS, J.D. WALKER & R.R. COLWELL, 1977,
Numerical taxonomy and ecology of petroleum degrading bacteria,
Appl. Environ. Microbiol., 34 (1), 60 - 68.

AXCELL B.C. & P.J. GEARY, 1973,
The metabolism of benzene by bacteria,
Biochem. J., 136, 927 - 934.

AXCELL B.C. & P.J. GEARY, 1975,
Purification and some properties of a soluble benzene-oxidizing
system from a strain of Pseudomonas,
Biochem. J., 146, 173 - 183.

AZOULAY E., 1966,
Métabolisme microbien des hydrocarbures paraffiniques à chaîne
droite,
Thèse de doctorat ès Sciences Physiques - Faculté des Sciences
de l'Université d'Aix-Marseille, 150 p.

BADENOCH - JONES J., R.E. SUMMONS, B. ENTSCH, B.G. ROLFE, C.W.
PARKER, 1982,
Mass spectrometric identification of indole compounds produced
by Rhizobium strains,
Biomed. Mass spectrom., 9 (10), 429 - 437.

BADGER G.M., J.K. DONNELLY & T.M. SPOTSWOOD, 1963,
Thin-layer chromatography using partially acetylated cellulose
as adsorbent,
J. Chromatogr., 10, 397 - 398.

BALAKRISHNAN R., S. KAUR, A.K. GOEL, S. PADMAVATHI & K.
JAYARAMAN, 1980,
Biosynthesis of polymyxin by Bacillus polymyxa II. On the
nature and interaction of the multienzyme complex with the end
product polymyxin,
Arch. Biochem. Biophys., 200 (1), 45 - 54.

BALSELLS R.E. & A.R. FRASCA, 1985,
Reacciones fotoquímicas del carbazol y derivados en
dichlorometano,
An. Asoc. Quim. Argent., 73 (2), 207 - 214.

BANWART W.L., P.M. PORTER, T.C. GRANATO & J.J. HASSETT, 1985,
HPLC separation and wavelength area ratios of more than 50
phenolic acids and flavonoids,
J. Chem. Ecol., 11 (3), 383 - 395.

BARKSDALE L. & K - S. KIM, 1977,
Mycobacterium,
Bacteriol. Rev., 41 (1), 217 - 372.

BARNSLEY E.A., 1976,
The bacterial degradation of fluoranthene and benzo(a)pyrene,
Can. J. Microbiol., 21, 1004 - 1008.

BARNSLEY E.A., 1978,
Role and regulation of the ortho and meta pathways of catechol
metabolism in pseudomonads metabolizing naphthalene and
salicylate,
J. Bacteriol., 125 (2), 404 - 408.

- BARTOS J & PESEZ, 1973,
Pratique de l'analyse organique colorimétrique et
fluorimétrique, Masson, 2ème édition, 325 p.
- BASTA N., 1984,
Biopolymers challenge petrochemicals,
High. Technol., Feb. 1984, 67 - 70.
- BAUER J.E. & D.G. CAPONE, 1985a
Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic
hydrocarbons anthracene and naphthalene intertidal marine
sediments,
Appl. Environ. Microbiol., 50 (1), 81 - 90.
- BAUER J.E. & D.G. CAPONE, 1985b
Effects of four aromatic organic pollutants on microbial
glucose metabolism and thymidine incorporation in marine
sediments,
Appl. Environ. Microbiol., 49 (4), 825 - 835.
- BAXTER R.L., 1985a,
Microbiological applications of NMR spectroscopy, part I.,
Microbiol. Sci., 2 (7), 203 - 211.
- BAXTER R.L., 1985b,
Microbiological applications of NMR spectroscopy, part II.,
Microbiol. Sci., 2 (11), 340 - 346.
- BAYLY R.C. & G.J. WIGMORE, 1973,
Metabolism of phenol and cresols by mutants of Pseudomonas
putida,
J. Bacteriol., 113 (3) 1112 - 1120
- BEAM H.W. & J.J. PERRY, 1973,
Co-metabolism as a factor in microbial degradation of
cycloparaffinic hydrocarbons,
Arch. Mikrobiol., 91, 87-90.
- BEAM H.W. & J.J. PERRY, 1974,
Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-
metabolism and commensalism,
J. Gen. Microbiol., 82, 163-169.
- BEDART D.L., R. UNTERMAN, L.H. BOPP, M.J. BRENNAN, M.L. HABERT
& C. JOHNSON, 1986,
Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for
the ability to degrade polychlorinated biphenyls,
Appl. Environ. Microbiol., 51, (4), 761-768.
- BEEBE J.L. & W.W. UMBREIT, 1971,
Extracellular lipid of Thiobacillus thiooxidans,
J. Bacteriol., 108, (1), 612-614.

BENDER D.F., E. SAWICKI & R.M. WILSON JR, 1964,
Fluorescent detection and spectrophotofluorometric
characterization and estimation of carbazoles and polynuclear
carbazoles separated by thin - layer chromatography,
Anal. Chem., 36 (6), 1011-1017.

Bergey's manual of determinative bacteriology, 1984,
R.E. Buchanan & N.E. Gibbons (eds), 9ème édition, The Williams
& Wilkins Company, Baltimore.

BERNHEIMER A.W. & L.S. AVIGAD, 1970,
Nature and properties of a cytolytic agent produced by Bacillus
subtilis,
J. Gen. Microbiol. 61, 361-369.

BERTRAND J.C., E. RAMBELOARISOA, J.F. RONTANI, G. GIUSTI & G.
MATTEI, 1983,
Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous
culture,
Biotechnol. Lett., 5, (8), 567-572.

BEST D.J., 1987,
Applications of biotechnology to chemical production,
Biocatalysis, 1, (1), 1-38.

BETTMANN H. & H.J. REHM, 1984,
Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 2, 285-290.

BHATTACHARYYA P.K. & K. GANAPATHY, 1965,
Microbiological transformations of terpenes : Part VI - Studies
on the mechanism of some fungal hydroxylation reactions with
the aid of model systems,
Indian J. Biochem., 2, 137-145.

BHOSLE N.B. & A. ROW, 1983,
Effect of dispersants on the growth of indigenous bacterial
population & Biodegradation of crude oil,
Indian J. Mar. Sci. 12, 194-196.

BIRD J.A. & R.B. CAIN, 1974,
Microbial degradation of Alkylbenzenesulphonates : Metabolism
of homologues of short alkyl - chain length by an alcaligenes
sp.,
Biochem. J., 140, 121-134.

BLAKLEY E.R., 1974,
The microbial degradation of cyclohexanecarboxylic acid : A
pathway involving aromatization to form p-hydroxybenzoic acid,
Can. J. Microbiol., 20, 1297-1306.

BLAKLEY E.R., 1978,
The microbial degradation of cyclohexanecarboxylic acid by a β -
oxidation pathway with simultaneous induction to the
utilization of benzoate,
Can. J. Microbiol., 24, 847-855.

- BLANCHARD D.C. & L.D. SYZDEK, 1978,
Seven problems in bubble and jet drop researches,
Limnol. Oceanogr., 23 (3), 389-400.
- BLOCH H., 1950,
Studies on the virulence of tubercle bacilli - Isolation and
biological properties of a constituent of virulent organisms,
J. Exp. Med., 91, 197-219.
- BLOCK J.C. & L. SCHWARTZBROD, 1982,
Méthodes de quantification in Analyse virologique des eaux,
techniques de mises en évidence des virus humains. 193-242,
Lavoisier, Paris.
- BODIE E.A., R.D. SCHWARTZ & A. CATENA, 1985,
Production and characterization of a polymer from Arthrobacter
sp.,
Appl. Environ. Microbiol., 50 (3), 629-633.
- BOHONOS N., T.W. CHOU & R.J. SPANGGORD, 1977,
Some observations on biodegradation of pollutants in aquatic
systems,
Jpn. J. Antibiot., 30 suppl., S 275- S 285.
- BORODKIN V.F., 1950,
The sulfonation of carbazole in organic solvents,
J. Appl. Chem. USSR, 23, 803-806.
- BOSSCHER J.K. & H. CERFONTAIN, 1968,
Aromatic sulphonation with sulphur trioxide in
trichlorofluoromethane as a solvent,
Tetrahedron, 24, 6543-6555.
- BOSSERT I.D., M.D. RIVERA & L.Y. YOUNG, 1986,
P-Cresol biodegradation under denitrifying conditions:
Isolation of a bacterial coculture,
FEMS Microbiol. Ecol., 38, 313-319.
- BOULANGER P., J. POLONOVSKI, F. TAYEAU, P. MANDEL & G. BISERTE,
1973,
Biochimie médicale, enzymes et métabolisme, Fascicule II,
Masson Ed., 10ème édition, 430p.
- BOURQUE D., J.G. BISAILLON, R. BEAUDET, M. SYLVESTRE, M.
ISHAQUE & A. MORIN, 1987.
Microbiological degradation of malodorous substances of swine
waste under aerobic conditions,
Appl. Environ. Microbiol., 53 (1), 137-141.

- BRADY R.O. & E.G. TRANIS, 1964,
The chemistry of lipids,
Ann. Rev. Biochem., 33, 75-100.
- BRENNAN P.J., M.P. FLYNN & P.F.S. GRIFFIN, 1970,
Acylglucoses in Escherichia coli, Saccharomyces cerevisiae and
Agaricus bisporus,
FEBS Lett., 8 (6), 322-324.
- BRILON C., W. BECKMANN, M. HELLWIG & H.J. KNACKMUSS, 1981a,
Enrichment and isolation of naphthalenesulfonic acid - utilizing
Pseudomonads,
Appl. Environ. Microbiol., 42 (1), 39-43.
- BRILON C., W. BECKMANN & H.J. KNACKMUSS, 1981b
Catabolism of naphthalenesulfonic acids by Pseudomonas sp. A3
and Pseudomonas sp. C22,
Appl. Environ. Microbiol., 42 (1), 44-55.
- BROOKS C.J.W., W.J. COLE & G.M. BARRETT, 1984,
Studies of cyclic Di - tert - Butylsilylene derivatives of
diols and hydroxy acids by gas chromatography - Mass
spectrometry,
J. Chromatogr., 315, 119-133.
- BRUHN C., H.LENKE & H.J. KNACKMUSS, 1987,
Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for
bacteria,
Appl. Environ. Microbiol., 53, (1), 208-210.
- CAIN R.B. & D.R. FARR, 1968,
Metabolism of arylsulphonates by micro-organisms,
Biochem. J., 106, 859-877.
- CALDER J.A. & J.H. LADER, 1976,
Effect of dissolved aromatic hydrocarbons on the growth of
marine bacteria in batch culture,
Appl. Environ. Microbiol., 32 (I), 95-101.
- CARDINI G. & P. JURTSUK, 1970,
The enzymatic hydroxylation of n-octane by Corynebacterium sp.
strain 7EIC,
J. Biol. Chem., 245 (II), 2789-2796.
- CERFONTAIN H., 1985,
Sulfur trioxide sulfonation of aromatic hydrocarbons,
Rec. Trav. Chim. Pays - Bas, 104, 153 - 165.
- CERNIGLIA C.E., 1984a,
Microbial metabolism of polycyclic hydrocarbons,
Adv. Appl. Microbiol., 30, 31 - 71.

CERNIGLIA C.E., 1984b

Aromatic hydrocarbons : Metabolism by bacteria, fungi and algae, in Reviews in biochemical toxicology Vol. 3, Hodgson E., J.R. Bend & R.M. Philpot (eds), Elsevier / North Holland publishing Co., New - York.

CERNIGLIA C.E., 1984c,

Microbial transformation of aromatic hydrocarbons, in Petroleum Microbiology, 99 - 128, Atlas R.M. (ed), Macmillan Publishing Company, New - York.

CERNIGLIA C.E. & S.K. YANG, 1984,

Stereoselective metabolism of anthracene and phenanthrene by the fungus Cunninghamella elegans, Appl. Environ. Microbiol., 47 (1), 119 - 124.

CERNIGLIA C.E., K.J. LAMBERT, D.W. MILLER & J.P. FREEMAN, 1984, Transformation of 1- and 2-Methylnaphtalene by Cunninghamella elegans,

Appl. Environ. Microbiol., 47 (1), 111 - 118.

CERNIGLIA C.E., D.W. MILLER, S.K. YANG & J.P. FREEMAN, 1984b, Effects of fluoro substituent on the fungal metabolism of 1-fluoronaphtalene,

Appl. Environ. Microbiol., 48 (2), 294 - 300.

CERNIGLIA C.E., J.P. FREEMAN & F.E. EVANS, 1984c,

Evidence for an arene oxide - NIH shift pathway in the transformation of naphtalene to 1-naphtol by Bacillus cereus, Arch. Microbiol., 138, 283 - 286.

CHAPMAN R.A. & C.M. COLE, 1982,

Observations of the influence of water and soil pH on the persistence of insecticides,

J. Environ. Sci. Health, B17 (5), 487 - 504.

CHEN W., K. OHMIYA, S. SHIMIZU & H. KAWAKAMI, 1985,

Degradation of dehydrodivanillin by anaerobic bacteria from low Rumen Fluid,

Appl. Environ. Microbiol., 49, (1), 211-216.

CICCIOLI P., E. BRANCALEONI, A. CECINATO, C. DI PALI, P. BUTTINI & A. LIBERTI, 1986.

Fractionation of polar polynuclear aromatic hydrocarbons present in industrial emissions and atmospheric samples and their determination by gas-chromatography - mass spectrometry, J. Chromatogr., 351, 451-464.

COLBERG P.J. & L.Y. YOUNG, 1985,

Aromatic and volatile acid intermediates observed during anaerobic metabolism of lignin - derived oligomers,

Appl. Environ. Microbiol., 49 (2), 350-358.

COLBY J., D.I. STIRLING & H. DALTON, 1977,
The soluble methane monooxygenase of Methylococcus capsulatus
(Bath),
Biochem. J., 165, 395-402.

COLLIN J.F., BLOCK J.C., IMBS M.A. & LABAU P., 1979
Contribution à l'étude des bactéries aérobies hétérotrophes
d'une boue activée,
J. Fr. Hydrol., 10, 47-58.

COOK A.M., W. HOGREFE, H. GROSSENBACHER & R. HÜTTER, 1983,
Biodegradation of xenobiotic compounds : Problems of enzyme
specificity and wide substrate spectrum in real wastes
containing s - triazines,
Biotechnol. Lett., 5 (12), 843-848.

COOPER D.G. & D.A. PADDOCK, 1984,
Production of a biosurfactant from Torulopsis bombicola,
Appl. Environ. Microbiol., 47 (1), 173-176.

COOPER D.G., J.E. ZAJIC & C. DENIS, 1981,
Surface active properties of a biosurfactant from
Corynebacterium lepus,
A. Amer. Oil Chem. Soc., 58, 77-80.

CORKE C.T., N.J. BUNCE, A. - L. BEAUMONT, R.L. MERRICK, 1979,
Diazonium cations as intermediates in the microbial
transformation of chloroanilines to chlorinated biphenyls,
azocompounds, and triazines,
J. Agr. Food Chem., 27 (3), 644-646.

DAGLEY S. & D.T. GIBSON, 1965,
The bacterial Degradation of catechol,
Biochem. J., 95, 466-474.

DAVID M., B. DROCHON, M. VUILHORGNE, 1986.
La spectrométrie de masse. De l'étude des structures
moléculaires au screening des souches productrices,
Biofutur. Nov., 115-118.

DAVIES J.I. & W.C. EVANS, 1964,
Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonas,
Biochem. J., 91, 251-261.

- DAVIES J.B. & RAYMOND R.L., 1961,
Oxidation of alkyl - substituted cyclic hydrocarbons by a Nocardia during growth on n - alkanes,
Appl. Microbiol., 9, 383-388.
- DE KLERK H. & A.C. VAN DER LINDEN, 1974,
Bacterial degradation of cyclohexane participation of a co-oxidation reaction,
Antonie Van Leeuwenhoek, 40, 7-15.
- DELAUNE R.D., W.H. PATRICK JR. & M.E. CASSELMAN, 1981,
Effect of sediment pH and Redox conditions on degradation of benzo (a) pyrene,
Mar. Poll. Bull., 12 (7), 251-253.
- DENNIS M.J., R.C. MASSEY, D.J. MC WEENEY, B. LARSSON, A. ERIKSSON & G. SAHLBERG, 1984,
Comparison of a capillary gas chromatographic and a high - performance liquid chromatographic method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in food,
J. Chromatogr., 285, 127-133.
- DERENBACH J.B., 1985,
Investigations into a small fraction of volatile hydrocarbons - I - Contamination of Atlantic and Baltic sea surface waters with C₃ - alkylated benzenes,
Mar. Chem., 15, 295-303.
- DIARRA B., F. VENIEN, A. LE GUYADER, J. VENIEN & M. CORMIER, 1984,
Oxydation photoinduite et biodégradation de naphtalènes dans l'eau de mer,
Environ. Technol. Lett., 7, 319-332.
- DIEDERICH F. & K. DICK, 1984,
A new Water - Soluble macrocyclic host of the cyclophane type : Host - Guest Complexation with Aromatic Guests in Aqueous solution and acceleration of the transport of Arenes through an aqueous phase,
J. Am. Chem. Soc., 106 (26), 8024-8036.
- DIEDERICH F. & D. GRIEBEL, 1984,
¹H NMR Investigations of Host - Guests complexation between a macrocyclic host of the cyclophane Type and aromatic Guest in aqueous solution,
J. Am. Chem. Soc., 106 (26), 8037-8046.
- DONALDSON E.C., 1984,
Microbiology for enhanced oil recovery,
Erdöl und Kohle, 37 (6), 245-248.
- DONOGHUE N.A. & P.W. TRUDGILL, 1975,
The metabolism of cyclohexanol by Acinetobacter NCIB 9871,
Eur. J. Biochem., 60, 1-7.

DORBON M., J.M. SCHMITTER, P. ARPINO & GUIOCHON, 1982,
Carbazoles et Lactames du pétrole : Méthode d'extraction et
caractérisation,
J. Chromatogr., 246, 255-269.

DORBON M., I. IGNATIADIS & P. ARPINO, 1984,
Chromatographie en phase gazeuse des dérivés méthylés du
carbazole,
Analusis, 12 (2), 96-99.

DORBON M., I. IGNATIADIS, J.M. SCHMITTER, P. ARPINO, G.
GUIOCHON, H. TOULHOAT & A. HUC, 1984,
Identification of carbazoles and benzocarbazoles in a coker gas
oil and influence of catalytic hydrotreatment on their
distribution,
Fuel, 63, 565-570.

DURHAM D.R., 1984,
Notes - Initial Reactions involved in the dissimilation of
mandelate by Rhodotorula graminis,
J. Bacteriol., 160 (2), 778-780.

DURHAM D.R. & J.J. PERRY, 1978,
Purification and characterization of a heme - containing amine
dehydrogenase from Pseudomonas putida,
J. Bacteriol., 134 (3), 837-843.

DURHAM D.R., C.G. Mc NAMEE & D.B. STEWART, 1984.
Dissimilation of aromatic compounds in Rhodotorula graminis :
Biochemical Characterization of pleiotropically negative
mutants,
J. Bacteriol., 160 (2), 771-777.

EATON R.W. & D.W. RIBBONS, 1982,
Metabolism of dibutylphthalate and phthalate by Micrococcus sp.
Strain 12B,
J. Bacteriol., 151 (1), 48-57.

EDWARD J.R. & J.A. HAYASHI, 1965,
Structure of a rhamnolipid from Pseudomonas aeruginosa,
Arch. Biochem. Biophys., 111, 415-421.

EHRSSON H., T. WALLE & H. BROTELL, 1971,
Quantitative gas chromatographic determination of picogram
quantities of phenols,
Acta Pharm. Suec., 8, 319-328.

ENDO K., H. KONDO & L. ISHIMOTO, 1977,
Degradation of benzenesulfonate to sulfite in bacterial
extract,
J. Biochem., 82, 1397-1402.

EVANS W.C., 1947,
Oxidation of phenol and benzoic acid by some soil bacteria,
Biochem. J., 41, 373-382.

- EVANS W.C., H.N. FERNLEY & E. GRIFFITHS, 1965,
Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil Pseudomonas,
Biochem. J., 95, 819-831.
- FATTOM A. & M. SHILO, 1984a,
Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria,
Appl. Environ. Microbiol., 47 (1), 135-143.
- FATTOM A. & M. SHILO, 1984b,
Phormidium J. - I bioflocculant : production and activity,
Arch. Microbiol., 139, 421-426.
- FATTOM A. & M. SHILO, 1985,
Production of emulcyan by Phormidium J - I : its activity and function,
FEMS Microbiol. Ecol., 31, 3-9.
- FEIST C.F. & G.D. HEGEMAN, 1969,
Phenol and benzoate metabolism by Pseudomonas putida :
Regulation of tangential pathways,
J. Bacteriol. 100 (2), 869-877.
- FOCHT D.D. & F.D. WILLIAMS, 1970,
The degradation of p - toluenesulfonate by a Pseudomonas,
Can. J. Microbiol., 16, 309-316.
- FOGHT J.M. & D.W.S. WESTLAKE, 1982,
Effect of the dispersant Corexit 9527 on the microbial degradation of Prudhoe Bay oil,
Can. J. Microbiol., 28, 117-122.
- FURUSAWA M., M. TACHIBANA & M. FUJISHIMA, 1983,
Determination of small amounts of carbazole in anthracene by synchronous fluorescence spectrometry,
Bull. Chem. Soc. Jpn., 56, 3509-3510.
- GANAPATHY K., K.S. KHANCHANDANI & P.K. BATTACHARYYA, 1966,
Microbiological transformations of terpenes : Part VII -
Further studies on the mechanism of fungal oxygenation reactions with the aid of model substrates,
Indian J. Biochem., 3, 66-70.
- GELLER S., 1983,
Statistique.
Masson, Paris, 4ème éd., 229 p.
- GERSON D.F. & J. AKIT, 1980,
Cell surface energy contact angles and phase partition II -
bacterial cells in biphasic aqueous mixtures,
Biochim. Biophys. Acta, 602, 281-284.
- GHOLSON R.K., J.N. BAPTIST & M.J. COON, 1963,
Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. II -
Cofactor requirements for octanol formation from octane,
Biochemistry, 2 (5), 1155-1159.

- GIBSON D.T., 1971,
The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons,
C.R.C. Crit. Rev. Microbiol., 1, 199-223.
- GIBSON D.T., J.R. KOCH & R.E. KALLIO, 1968,
Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by
microorganisms. I - enzymatic formation of catechol from
benzene,
Biochemistry, 7 (7), 2653-2662.
- GIBSON D.T., G.E. CARDINI, F.C. MASELES & R.E. KALLIO, 1970,
Incorporation of oxygen- 18 into benzene by Pseudomonas putida,
Biochemistry, 9 (7), 1631-1635,
- GIBSON D.T., V. MAHADEVAN, D.M. JERINA, H. YAG & H.J.C. YEH,
1975,
Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and
benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium,
Science, 189, 295-297.
- GOODFELLOW M. & D.E. MINNIKIN, 1977,
Nocardioform bacteria,
Ann. Rev. Microbiol., 31, 159-180.
- GOTTSCHALK G., 1985,
Bacterial metabolism (2 ed.), Springer Verlag, New-York, 359
pages.
- GRIFFIN M. & P.W. TRUDGILL, 1976,
Purification and Properties of cyclopentanone Oxygenase of
Pseudomonas NCIB 9872,
Eur. J. Biochem., 63, 199-209.
- GRIFFITHS E. & W.C. EVANS, 1965,
A cell - free perhydroxylase system from soil Pseudomonads,
with activity on aromatic hydrocarbons,
Biochem. J., 95, 51p - 52p.
- HAMMOND P.M., C.P. PRICE & B. SAVAGE, 1986,
Enzymatic drug assay,
I.C.P.R., nov./dec., 18-27.
- HAUSER G. & M.L. KARNOVSKY, 1954,
Studies on the production of glycolipide by Pseudomonas
aeruginosa,
J. Am. Chem. Soc., 68, 645-654.
- HAWTHORNE S.B. & D.J. MILLER, 1986,
Water chemical ionization mass spectrometry of aldehydes,
ketones, esters and carboxylic acids,
Appl. Spectroscopy, 40 (8), 1200-1211.
- HEGEMAN G.D., 1966,
Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by
Pseudomonas putida,
J. Bacteriol. 91 (3), 1140-1154.

HERRMANN F., O. DUFKA & J. CHURACEK, 1986,
Fused - silica capillary gas chromatography - mass spectrometry
of some dicarboxylic acids present in condensation - type
polymers - I - Dimethyl esters,
J. Chromatogr., **360**, 79-88.

HIGGINS J., D.J. BEST, G. MACKINNON & P.J. WARNER, 1984,
Ecological strategies for the fermentation industry, recruitment
of novel reactions : examples and strategies in Current
Perspectives in Microbial ecology, 629-635, KLUG M.J. & C.A.
REDDY (eds), American Society for Microbiology Washington D.C.

HILL E.C., 1969,
Microbiological examination of petroleum products,
Tribology, Feb. 5-10.

HISATSUKA K.I., T. NAKAHARA, N. SANO & K. YAMADA, 1971,
Formation of rhamnolipid by Pseudomonas aeruginosa and its
function in hydrocarbon fermentation,
Agr. Biol. Chem., **35** (5), 686-692.

HISATSUKA K., T. NAKAHARA & K. YAMADA, 1972,
Protein - like activator for n-alkane oxidation by Pseudomonas
aeruginosa S₇ B₁,
Agr. Biol. Chem., **36** (8), 1361-1369.

HÖGN T. & L. JAENICKE, 1972,
Benzene metabolism of Moraxella species,
Eur. J. Biochem., **30**, 369-375.

HRSAK D., M. BOSNJAK & V. JOHANIDES, 1982,
Enrichment of linear alkylbenzenesulphonate (LAS) degrading
bacteria in continuous culture,
J. Appl. Bacteriol., **53**, 413-422.

HUG H., H.W. BLANCH & A. FIECHTER, 1974,
The functional role of lipids in hydrocarbon assimilation,
Biotechnol. Bioeng., **16**, 965-985.

HUTBER G.N. & D.W. RIBBONS, 1983,
Involvement of Coenzyme A esters in the metabolism of benzoate
and cyclohexanecarboxylate by Rhodopseudomonas palustris,
J. Gen. Microbiol., **129**, 2413-2420.

HWANG H.M., R.E. HODSON & R.F. LEE, 1985,
Photochemical and microbial degradation of 2, 4, 5 -
trichloroaniline in a freshwater lake,
Appl. Environ. Microbiol., **50** (5), 1177-1180.

- IARC, 1983,
IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, 32, 239-245.
- IGNATIADIS I., M. DORBON & P.J. ARPINO, 1985,
Analyse comparative et identification des dérivés du carbazole extraits de deux pétroles bruts du Congo,
Analusis, 9, 406-414.
- IGNATIADIS I., M. KUROKI & P.J. ARPINO, 1986a,
Identification of carbazole derivatives in a hydrotreated coker gas oil by gas chromatography and gas chromatography - mass spectrometry,
J. Chromatogr., 366, 251-260.
- IGNATIADIS I., P.J. ARPINO & M. DORBON, 1986b,
Carbazoles, benzocarbazoles et dibenzocarbazoles des pétroles et de produits pétroliers,
Rev. Inst. Franc. Petrole, 41 (4), 551-573.
- IONEDA T., E. LEDERER & J. ROZANIS, 1970,
Sur la structure des diesters de tréhalose ("cord factors") produits par Nocardia Asteroides et Nocardia Rhodochrous,
Chem. Phys. Lipids, 4, 375-392.
- ITOH S. & S. INOUE, 1982,
Sophorolipids from Torulopsis bonbicola : possible relation to alkane uptake,
Appl. Environ. Microbiol., 43 (6), 1278-1283.
- ITOH S. & T. SUZUKI, 1972,
Effect of Rhamnolipids on growth of Pseudomonas aeruginosa mutant deficient in n - Paraffin - utilizing ability,
Agr. Biol. Chem., 36 (12), 2233-2235.
- ITOH S. & T. SUZUKI, 1974,
Fructose - lipids of Arthrobacter, Corynebacteria, Nocardia and Mycobacteria grown on fructose,
Agr. Biol. Chem., 38 (8), 1443-1449.
- IZUMORI K., T. MIYOSHI, S. TOKUDA & K. YAMABE, 1984,
Production of D - tagatose from dulcitol by Arthrobacter globiformis,
Appl. Environ. Microbiol., 46 (5), 1055-1057.
- JARVIS F.G. & M.J. JONHSON, 1949,
A glyco - lipid produced by Pseudomonas aeruginosa,
J. Am. Chem. Soc., 71, 4124-4126.
- JAVAHERI M., G.E. JENNEMAN, M.J. Mc INERNEY & R.M. KNAPP, 1985,
Anaerobic production of a biosurfactant by Bacillus licheniformis JF - 2,
Appl. Environ. Microbiol., 50 (3), 698-700.

JERINA D.M., DALY J.W., A.M. JEFFREY & D.T. GIBSON, 1971,
Communication : CIS-1,2-dihydroxy-1,2-dihydronaphtalene :
A bacterial Metabolite from naphtalene,
Arch. Biochem. Biophys. 142, 394-396.

JOBSON A., F.D. COOK & D.W.S. WESTLAKE, 1972,
Microbial utilization of crude oil,
Appl. Microbiol., 23 (6), 1082-1089.

JONSSON P. & T. WADSTRÖM, 1983,
High Surface Hydrophobicity of Staphylococcus aureus as
revealed by Hydrophobic interaction chromatography.
Curr. Microbiol., 8, 347-353.

JONSSON P. & T. WADSTRÖM, 1984,
Cell surface Hydrophobicity of Staphylococcus aureus measured
by the salt aggregation test (SAT),
Curr. Microbiol., 10, 203-210.

JUNI E. & A. JANIK, 1969,
Transformation of Acinetobacter calcoaceticus (Bacterium
anitratum),
J. Bacteriol., 98 (1), 281-288.

KANEDA T., 1974,
Enzymatic aromatization of 4 - ketocyclohexanecarboxylic acid
to p - hydroxybenzoic acid,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 58 (1), 140-144.

KAPLAN N. & E. ROSENBERG, 1982,
Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier Production
by Acinetobacter calcoaceticus BD4 and BD413,
Appl. Environ. Microbiol., 44 (2), 1335-1341.

KÄPPELI O. & A. FIECHTER, 1981,
Properties of hexadecane uptake by Candida tropicalis,
Curr. Microbiol., 6, 21-26.

KÄPPELI O. & W.R. FINNERTY, 1979,
Partition of alkane by an extracellular vesicle derives from
hexadecane - grow Acinetobacter,
J. Bacteriol., 140 (2), 707-712.

KÄPPELI O. & W.R. FINNERTY, 1980,
Characteristics of hexadecane partition by the grown medium of
Acinetobacter sp.,
Biotechnol. Bioengin., 22, 495-503.

KÄPPELI O., M. MÜLLER & A. FIECHTER, 1978,
Chemical and structural alterations at the cell surface of
Candida tropicalis, induced by hydrocarbon substrate,
J. Bacteriol., 133 (2), 952-958.

KATZ E. & A.L. DEMAIN, 1977,
The peptide antibiotics of Bacillus : Chemistry, Biogenesis and
possible functions,
Bacteriol. Rev., 41 (2), 449-474.

KAWAHARA F.K. & Y.Y. YANG, 1976,
Systems chemical analysis of petroleum pollutants,
Anal. Chem., 48 (4), 651-655.

KAWAHARA F.K., J.R. DUNN, R.A. FIUTEM & P.J. Mc CULLOUGH, 1982,
Determination of benzidines by gas chromatographic separation
of derivatives with electron capture detection,
Anal. Chim. Acta., 138, 207-220.

KAWASHIMA H., T. NAKAHARA, M. OOGAKI & TABUCHI, 1983,
Extracellular production of a mannosylerythritol lipid by a
mutant of Candida sp. from n - alkanes and triacylglycerols,
J. Ferment. Technol., 61 (2), 143-149.

KIKUCHI M., 1985,
Biodegradation of some surfactants in River Water with relation
to chemical structure and water temperature,
Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 51 (II), 1859-1864.

KIKUCHI M. & M. WAKABAYASHI, 1984,
Lethal response of some surfactants to medaka Oryzias latipes
with relation to chemical structure,
Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 50 (7), 1235-1240.

KIYOHARA H. & K. NAGAO, 1977,
Enzymatic conversion of 1-Hydroxy-2-naphthoate in phenanthrene-
grown Aeromonas sp. S45PI,
Agric. Biol. Chem., 41 (4), 705-707.

KIYOHARA H, K. NAGAO & R. NOMI, 1976,
Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an Aeromonas
sp.
Agric. Biol. Chem., 40 (6), 1075-1082.

KIYOHARA H, K. NAGAO & K. YANO, 1981,
Isolation and some properties of NAD-linked 2-
Carboxybenzaldehyde dehydrogenase in Alcaligenes faecalis AFK2
grown on phenanthrene,
J. Gen. Appl. Microbiol., 27, 443-455.

KIYOHARA H, K. NAGAO, K. KOUNO & K. YANO, 1982,
Phenanthrene-degrading phenotype of Alcaligenes faecalis AFK2,
Appl. Environ. Microbiol., 43 (2), 458-461.

KJELLEBERG S., C. LAGERCRANTZ & T. LARSSON, 1980,
Quantitative analysis of bacterial hydrophobicity studied by
the binding of dodecanoic acid,
FEMS Microbiol. Lett., 7, 41-44.

KOEBERG - TELDER A. & H. CERFONTAIN, 1971,
Aromatic sulfonation 28. Degree of ortho - substitution in the
sulfonation of toluene with sulfur trioxide,
methanepysulfonic acid and fuming sulfuric acid - A
mechanistic picture,
Rec. Trav. Chim. Pays-Bas, 90, 193-206.

KORHONEN I.O.O., 1986a,
Gas-liquid chromatographic analyses XLVII. Retention increments
of some lower saturated branched - chain, unsaturated and
chlorinated esters of benzoic, 4 - nitrobenzoic and 3,5 -
dinitrobenzoic acids on SE - 30 and OV - 351 capillary columns,
J. Chromatogr., 360, 63-78.

KORHONEN I.O.O., 1986b,
Gas - liquid chromatographic analyses. XLVI. Separation of C₃ -
C₅ branched - chain, C₃ - C₆ unsaturated and ethyl and -
chloroethyl esters of benzoic, 4 - nitrobenzoic and 3,5 -
dinitrobenzoic acids on SE - 30 and OV - 351 capillary columns
with Temperature programming,
J. Chromatogr., 357, 107-118.

KRASLAWSKI A. & J.M. KULAWINEK, 1983,
Analysis of the sulphonation products of 2 - amino - I -
naphthalene sulphonic acid by high - performance liquid
chromatography,
J. Chromatogr., 254, 322-326.

KRAUSS E.M. & S.I. CHAN, 1983,
Complexation and phase transfer of nucleotides by gramicidin S,
Biochemistry, 22, 4280-4291.

KREIKENBOHM R. & N. PFENNIG, 1985,
Anaerobic degradation of 3, 4, 5-trimethoxybenzoate by a
defined mixed culture of Acetobacterium woodii, Pelobacter
acidigallici, and Desulfobacter postgatei,
FEMS Microbiol. Lett., 31, 29-38.

KRETSCHMER A., H. BOCK & F. WAGNER, 1982,
Chemical and physical characterization of interfacial-active
lipids from Rhodococcus erythropolis grown on n - alkanes,
Appl. Environ. Microbiol., 44 (4), 864-870.

LAKOWICZ J.R. & C.J. ANDERSON, 1980,
Permeability of lipid bilayers to methylmercuric chloride :
Quantification by fluorescence quenching of a carbazole -
labeled phospholipid,
Chem. Biol. Interactions, 30, 309-323.

LANG S., A. GIBSON, C. SYLDATK & F. WAGNER, 1984,
Comparison of interfacial-active properties of glycolipids from
microorganisms, in Surfactants in solution, Mittal K.L. &
Lindman B. (Eds), Plenum Press, New-York, 1365-1372.

LARKIN M.J. & M.J. DAY, 1985,
The effect of pH on the selection of carbaryl - degrading
bacteria from garden soil,
J. Appl. Bacteriol., 58, 175-185.

LARKIN M.J. & M.J. DAY, 1986,
The metabolism of carbaryl by three bacterial isolates
Pseudomonas spp. (NCIB 12042 & 12043) and Rhodococcus sp. (NCIB
12038) from garden soil,
J. Appl. Bacteriol., 60, 233-242.

LATORRE J., W. REINEKE & H.- J. KNACKMUSS 1984,
Microbial metabolism of chloroanilines : enhanced evolution by
natural genetic exchange,
Arch. Mikrobiol., 140, 159-165.

LEADBETTER E.R. & J.W. FOSTER, 1960,
Bacterial oxidation of gaseous alkanes,
Arch. Mikrobiol., 35, 92-104.

LEHNINGER A.L., 1982,
Principes de biochimie, Flammarion Médecine - Sciences, 1006 p.

LENNOX J.E. & M.J. KUCHERA, 1986,
pH & Microbial growth,
Amer. Biol. Teach., 48 (4), 239-241.

LE PETIT J. & H.H. N'GUYEN, 1976,
Besoins en phosphore des bactéries métabolisant les
hydrocarbures en mer,
Can. J. Microbiol., 22 (9), 1364-1373.

LE PETIT J. & S. TAGGER, 1976,
Dégradation des hydrocarbures en présence d'autres substances
organiques par des bactéries isolées de l'eau de mer,
Can. J. Microbiol., 22 (11), 1654-1657.

LICHTENTHALER R.G. & F. ORELD, 1983,
Rapid High-Performance liquid chromatographic method for
hydrocarbon class separation in environmental samples,
J. Chromatogr., 282, 501-507.

LINDAHL M., A. FARIS, T. WADSTRÖM & S. HJERTEN, 1981,
A new test based on "salting out" to measure relative surface
hydrophobicity of bacterial cells,
Biochim. Biophys. Acta., 677, 471-476.

LIU D., 1983,
Fate of oil dispersants in aquatic environment,
Sci. Total Envir., 32, 93-98.

- LODE A., 1986,
Changes in the bacterial community after application of oil
sludge to soil,
Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 295-299.
- LOW G.K. - C., G.E. BATLEY, R.O. LIDGARD & A.M. DUFFIELD, 1986,
Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal fly
ash using gas chromatography/Negative ion chemical ionization
mass spectrometry,
Biomed. Environ. Mass Spectrom., 13, 95-104.
- MAC KENNA E.J. & R.E. KALLIO, 1971,
Microbial metabolism of the isoprenoid alkane Pristane,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68 (7), 1552-1554.
- MADHOSINGH C. & W. ORR, 1984,
Biodegradation of fatty acylamino acids by Fusarium culmorum,
J. Environ. Sci. Health, B19 (4 & 5), 491-499.
- MAKULA R.A., P.J. LOCKWOOD & W.R. FINNERTY, 1975,
Comparative analysis of the lipids of *Acinetobacter* species
grown on hexadecane,
J. Bacteriol., 121 (1), 250-258.
- MALONEY S.W., J. MANEM, J. MALLEVIALLE & F. FIESSINGER, 1986,
Transformation of trace organic compounds in drinking water by
enzymatic oxidative coupling,
Environ. Sci. Technol., 20, 249-253.
- MASSE R., M. BADR, D. AYOTTE & M. SYLVESTRE, 1985,
Gas chromatographic - Mass spectrometric characterization of
bacterial metabolites of 4 - nitrobiphenyl formed in Gram -
negative strain B - 206,
Toxicol. Environ. Chem., 10, 225-246.
- MASUGANA S., Y. URUSHIGAWA & Y. YONEZAWA, 1986,
Biodegradation pathway of O - cresol by heterogeneous culture
Phenol acclimated activated sludge,
Water res., 20 (4), 477-484.
- MATSUMOTO H. & T. KASHIMOTO, 1985,
Average daily respiratory intake of polycyclic aromatic
hydrocarbons in ambient air determined by capillary gas
chromatography,
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34, 17-23.
- MATSUSHITA H. & Y. SUZUKI & H. SAKABE, 1963,
The separation and determination of polycyclic aromatic
hydrocarbons by thin layer chromatography,
Bull. Chem. Soc. Jpn., 3, 1371.
- MATTEI G. & J.C. BERTRAND, 1985,
Production of biosurfactants by a mixed bacteria population
grown in continuous culture on crude oil,
Biotechnol. Lett., 7 (4), 217-222.

MINARD R.D., S. RUSSEL & J.M. BOLLAG, 1977,
Chemical transformation of 4 - Chloroaniline to a triazene in a
bacterial Culture medium,
J. Agr. Food Chem., 25 (4), 841-844.

MIORNER H., G. JOHANSSON & G. KRONVALL, 1983,
Lipoteichoic acid is the major cell wall component responsible
for surface hydrophobicity of group A Streptococci,
Infec. Immunity, 39 (1), 336-343.

MISHIMA M., M. ISURUGI, A. TANAKA & S. FUKUI, 1977,
Lipids of Candida tropicalis and Candida lipolytica grown on n
- alkanes and on glucose,
Agr. Biol. Chem., 41 (3), 517-520.

MOLIN G. & I. NILSSON, 1985,
Degradation of phenol by Pseudomonas putida ATCC 11172 in
continuous culture at different ratios of biofilm surface to
culture volume,
Appl. Environ. Microbiol., 50 (4), 946-950.

MONTREUIL J. & G. SPIK, 1963,
Microdosage des glucides - Méthodes colorimétriques des dosages
des glucides totaux,
Monographie n° 1 du Laboratoire de Chimie Biologie de la
Faculté des Sciences de Lille, 147 p.

MONTVILLE T.J., N. PARRIS & L.K. CONWAY, 1985,
Influence of pH on organic acid production by Clostridium
sporogenes in test tube and fermentor cultures,
Appl. Environ. Microbiol., 49 (4), 733-736.

MULKINS-PHILLIPS G.J. & J.E. STEWARD, 1974,
Effect of four dispersants on biodegradation and growth of
bacteria on crude oil,
Appl. Microbiol., 28 (4), 547-552.

NAKAJIMA K., A. SATO, T. MISONO, T. IIDA & K. NAGAYASU, 1974,
Microbial oxidation of the isoprenoid alkane pristane,
Agr. Biol. Chem., 38 (10), 1859-1865.

NAKAJIMA K., A. SATO, Y. TAKAHARA & T. IIDA, 1985a,
Microbial oxidation of isoprenoid, alkanes, phytane,
norpristane and farnesane,
Agr. Biol. Chem., 49 (7), 1993-2002.

NAKAJIMA K., A. SATO, Y. TAKAHARA & T. IIDA, 1985b,
Microbial oxidation of isoprenoid hydrocarbon, 1 - pristene,
Agr. Biol. Chem., 49 (9), 2763-2765.

NEIJSSSEL O.M. & D.W. TEMPEST, 1975,
The regulation of carbohydrate metabolism in Klebsiella
aerogenes NCTC 418 Organisms, growing in chemostat culture,
Arch. Microbiol., 106, 251-258.

NEILSON A.H., A.- S. ALLARD & M. REMBERGER, 1985,
Biodegradation and transformation of recalcitrant compounds, in
The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 2/Part C,
Hüttinger O. (ed.), Springer - Verlag Berlin, 29-86.

NESNOW S., S. LEAVITT, R. EASTERLING, R. WATTS, S.H. TONEY, L.
CLAXTON, R. SANGAIAH, G.E. TONEY, J. WILEY, P. FRAHER & A.
GOLD, 1984,
Mutagenicity of cyclopenta - fused isomers of benz (a)
anthracene in bacterial and rodent cells and identification of
the major rat liver microsomal metabolites,
Cancer. Res., 44, 4993-5003.

NEUFELD R.J. & J.E. ZAJIC, 1984,
The surface activity of Acinetobacter calcoaceticus sp. 2CA2,
Biotechnol. Bioeng., 26, 1108-1113.

NICHOLS P.D., J.B. GUCKERT & D.C. WHITE, 1986,
Determination of monounsaturated fatty acid double - bond
position and geometry for microbial monocultures and complex
consortia by capillary GC - MS of their dimethyl disulphide
adducts,
J. Microbiol. Meth., 5, 49-55.

NORRIS D.B. & P.W. TRUDGILL, 1971,
The metabolism of cyclohexanol by Nocardia globerula CL I,
Biochem. J., 121, 303-370.

NYHOLM N., P. LINDGAARD - JRGENSEN & N. HANSEN, 1984,
Biodegradation of 4 - nitrophenol in standardized aquatic
degradation tests,
Ecotoxicol. Environ. Safety, 8, 451-470.

OBRUKA K., A. KOLONICNY & K. RUZICKA, 1976,
Analysis of products from sulfonation of anthracene by thin -
layer chromatography on cellulose and by low - pressure liquid
chromatography,
Chem. Prum., 26 (11), 584-587.

OFEK I., E. WHITNACK & E.H. BEACHEY, 1983,
Hydrophobic interactions of group A Streptococci with
hexadecane droplets,
J. Bacteriol., 154 (1), 139-145.

OGAWA H., Y. ICHIMURA, T. CHIHARA, S. TERATANI & K. TAYA, 1986,
Methylation of alcohols, phenols and Carboxylic acids, and
selective monomethylation of diol and dicarboxylic acids with
dimethylsulfate by use of alumina,
Bull. Chem. Soc. Jpn, 59, 2481-2483.

O'GRADY D.P., P.H. HOWARD & A.F. WERNER, 1985,
Activated sludge biodegradation of 12 commercial phthalate
esters,
Appl. Environ. Microbiol., 49 (2), 443-445.

OOYAMA J. & J.W. FOSTER, 1965,
Bacterial oxidation of cycloparaffinic hydrocarbons,
Antonie Van Leeuwenhoek, 31, 45-65.

ORNSTON L.N. & W.K. YEH, 1982,
Origins of metabolic diversity. Evolutionary divergence by
sequence repetition,
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 76, 3996-4002.

PARKER N.D. & C.B. MUNN, 1984,
Increased cell surface hydrophobicity associated with
possession of an additional surface protein by Aeromonas
salmonicida,
FEMS Microbiol. Lett., 21, 233-237.

PATEL R.N., C.T. HOU, A.I. LASKIN & A. FELIX, 1982,
Microbial oxidation of hydrocarbons : Properties of a soluble
methane monooxygenase from a facultative methane-utilizing
organism, Methylobacterium sp. Strain CRL - 26,
Appl. Environ. Microbiol., 44 (5), 1130-1137.

PAUL J.H. & W.H. JEFFREY, 1985,
Evidence for separate adhesion mechanisms for hydrophilic and
hydrophobic surfaces in Vibrio proteolytica,
Appl. Environ. Microbiol., 50 (2), 431-437.

PAULUS H., 1967,
Polymyxins in Antibiotics volume II : Biosynthesis, Gottlieb D.
& P.D. Shaw (eds), Springer - Verlag Berlin, 254-267.

PETERSON J.A., M. KUSUNOSE, E. KUSUNOSE & M.J. COON, 1967,
Enzymatic - oxidation - II : Function of Rubredoxin as the
electron carrier in - hydroxylation,
J. Biol. Chem., 242 (19), 4334-4340.

PETERSON J.A. & M.J. COON, 1968,
Enzymatic - oxidation - III : Purification and properties of
Rubredoxin, a component of the - hydroxylation system of
Pseudomonas oleovorans,
J. Biol. Chem., 243 (2), 329-334.

PIETRZYK D.J. & C. - H. CHU, 1977a,
Amberlite XAD copolymers in Reversed phase gravity flow and
high pressure liquid chromatography,
Anal. Chem., 49 (6), 757-764.

PIETRZYK D.J. & C. - H. CHU, 1977b
Separation of organic acids on Amberlite XAD copolymers by
reversed phase high pressure liquid chromatography,
Anal. Chem., 49 (6), 860-867.

PIETRZYK D.J. & J.D. STODOLA, 1981,
Characterization and applications of Amberlite XAD-4 in
preparative liquid chromatography,
Anal. Chem., 53 (12), 1822-1828.

PINES O. & D. GUTNICK, 1984,
Specific binding of a bacteriophage at a hydrocarbon - water
interface,
J. Bacteriol., 157 (1), 179-183.

PITTER P., 1984,
Correlation between the structure of aromatic compounds and the
rate of their biological degradation,
Coll. Czechoslovak Chem. Commun., 49, 2891-2896.

PITTER P., 1985,
Correlation of Microbial degradation rates with the chemical
structure,
Acta Hydrochim. Hydrobiol., 13 (4), 453-460.

PORTER Q.N. & J. BALDAS, 1971,
Mass Spectrometry of heterocyclic Compounds,
Weissberger A. & E.C. TAYLOR (eds) Wiley - Interscience, Inc.
New-York, 564 p.

PROSHECHKINA T.I., V.I. SHISHKINA, N.D. NEGODYAEV & G.M.
NOVIKOVA, 1969a,
Structure and Chemical reactions of carbazole and its
derivatives XXX - Chlorosulfonation of Carbazole,
Izv. Vyssh. Uch. Zav. Khim. Khim. Tekhnol., 12 (7), 903-906.

PROSHECHKINA T.I., V.I. SHISHKINA, V.F. DEGTAREV, G.M.
NOVIKOVA & N.D. NEGODYAEV, 1969b,
Structure and chemical transformations of carbazole and its
derivatives XXIII - Structure of Carbazole sulfonyl chlorides,
Izv. Vyssh. Uch. Zav. Khim. Khim. Tekhnol., 12 (10), 1424-1427.

PUJAR B.G. & P.K. BHATTACHARYYA, 1973a,
Microbiological transformation of terpenes : Part XVII -
Fermentation of 1- -menthene and 3- -menthene by a soil
Pseudomonas (PL - Strain),
Indian J. Biochem. Biophys., 10, 164-169.

PUJAR B.G. & P.K. BHATTACHARYYA, 1973b,
Microbiological transformation of terpenes : Part XVIII -
Pathway of degradation of 1- -menthene in a soil Pseudomonas
(PL - Strain),
Indian J. Biochem. Biophys., 10, 170-172.

RAABE T., M. APPEL & F. LINGENS, 1984,
Degradation of p - toluidine by Pseudomonas testosteroni,
FEMS Microbiol. Lett., 25, 61-64.

RADKE M., H. WILLSCH & D.H. WELTE, 1984,
Class Separation of aromatic compounds in rock extracts and
fossil fuel by liquid chromatography,
Anal. Chem., 56 (13), 2538-2546.

RAMBELOARISOA E., J.F. RONTANI, G. GIUSTI, Z. DUVNJAK & J.C. BERTRAND, 1984,
Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria
isolated from sea - surface foams,
Mar. Biol., 83, 69-81.

RANDERATH K., 1971,
Chromatographie sur couches minces,
Gauthier - Villars (ed) Paris, 2ème édition, 450 p.

RAPP P., H. BOCK, V. WRAY & F. WAGNER, 1979,
Formation, Isolation and characterization of trehalose
dimycolates from Rhodococcus erythropolis grown on n - alkanes,
J. Gen. Microbiol., 115, 491-503.

REDDY P.G., H.D. SINGH, P.K. ROY & J.N. BARUAH, 1982,
Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial
uptake of hydrocarbons,
Biotechnol. Bioeng., 24, 1241-1269.

REDDY P.G., H.D. SINGH, M.G. PATHAK, S.D. BHAGAT & J.N. BARUAH,
1983,
Isolation and functional characterization of hydrocarbon
emulsifying and solubilizing factors produced by a Pseudomonas
species,
Biotechnol. Bioeng., 25, 387-401.

REHM H.J. & J. REIFF, 1981,
Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long - chain
alkanes,
Adv. Biochem. Eng., 19, 175-215.

REILING H.E., U. THANEI-WYSS, L.H. GUERRA-SANTOS, R. HIRT, O.
KÄPPELI & A. FIECHTER, 1986,
Pilot plant production of Rhamnolipid biosurfactant by
Pseudomonas aeruginosa,
Appl. Environ. Microbiol., 51 (5), 985-989.

REISFELD A., E. ROSENBERG & D. GUTNICK, 1972,
Microbial degradation of crude oil : Factors affecting the
dispersion in sea water by mixed and pure cultures,
Appl. Microbiol., 24 (3), 363-368.

RIBBONS D.W. & R.W. EATON, 1982,
Chemical transformations of aromatic hydrocarbons that support
the growth of microorganisms, in Biodegradation and
detoxification of Environmental pollutants, 59-84, Chakrabarty
A.M. (ed.), CRC Press, Inc.

RIBBONS D.W. & P.J. SENIOR, 1970,
2,3-dihydroxybenzoate 3,4-oxygenase from Pseudomonas fluorescens
- oxidation of a substrate analog,
Arch. Biochem. Biophys., 138, 557-565.

RISTAU E. & F. WAGNER, 1983,
Formation of novel anionic trehalosetetraesters from
Rhodococcus erythropolis under growth limiting conditions,
Biotechnol. Lett., 5 (2), 95-100.

ROGERSON A. & J. BERGER, 1981,
The toxicity of the dispersant Corexit 9527 and oil -
dispersant mixtures to ciliated protozoa,
Chemosphere, 10, 33-39.

RONTANI J.F., E. RAMBELOARISOA, J.C. BERTRAND & G. GIUSTI,
1985a,
Degradation of alkyl-substituted benzenes and their
photooxidation products by a marine mixed bacterial population,
Mar. Environ. Res., 16, 301-314.

RONTANI J.F., E. RAMBELOARISOA, J.C. BERTRAND & G. GIUSTI,
1985b,
Favourable interaction between photooxidation and bacterial
degradation of anthracene in sea water,
Chemosphere, 14 (11/12), 1909-1912.

ROSENBERG E., A. PERRY, D.T. GIBSON & D.L. GUTNICK, 1979,
Emulsifier of Arthrobacter RAG-1 : Specificity of hydrocarbon
substrate,
Appl. Environ. Microbiol., 37 (3), 409-413.

ROSENBERG E., N. KAPLAN, O. PINES, M. ROSENBERG & D. GUTNICK, 1983,
Capsular polysaccharides interfere with adherence of
Acinetobacter calcoaceticus to hydrocarbon,
FEMS Microbiol. Lett., 17, 157-160.

ROSENBERG M., 1984,
Bacterial adherence to hydrocarbons : a useful technique for
studying cell surface hydrophobicity,
FEMS Microbiol. Lett., 22, 289-295.

ROSENBERG M., D. GUTNICK & E. ROSENBERG, 1980
Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for
measuring cell - surface hydrophobicity,
FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33.

ROSENBERG M., E.A. BAYER, J. DELAREA & E. ROSENBERG, 1982,
Role of thin fimbriae in adherence and growth of Acinetobacter
calcoaceticus RAG - 1 on hexadecane,
Appl. Environ. Microbiol., 44 (4), 929-937.

SALA-TREPAT J.M. & W.C. EVANS, 1971,
The meta-cleavage of catechol by Azotobacter species - 4-
Oxalocrotonate pathway,
Eur. J. Biochem., 20, 400-413

SALMON I. & A.T. BULL, 1984,
Mixed - culture fermentations in industrial microbiology in
Current perspectives in microbial ecology, Klug M.J. & C.A.
Reddy (eds), American Society for Microbiology, Washington
D.C., 656-666.

SARIASLANI F.S. & J.P. ROSAZZA, 1985,
Biotransformations of I', 2' - dihydrorotenone by Streptomyces
griseus,
Appl. Environ. Microbiol., 49 (2) 451-452.

SAMAIN E., G. ALBAGNAC & H.C. DUBOURQUIER, 1986,
Initial steps of catabolism of trihydroxybenzenes in Pelobacter
acidigallici,
Arch. Microbiol., 144, 242-244.

SAWICKI E., T.W. STANLEY & H. JOHNSON, 1964.
Direct Spectrophotofluorometric analysis of aromatic compounds
on thin - layer chromatograms,
Microchem. J., 8, 257-284.

SAWYER C.N. & D.W. RYCKMAN, 1957,
Anionic Synthetic detergents and water supply problems,
J.A.W.W.A., 49, 480-490.

SCHMITTER J.M. & P.J. ARPINO, 1985,
Azaarenes in fuels,
Mass spectrom. Rev., 4, 87-121.

SCHULTZ T.W., 1983,
Aquatic Toxicology of Nitrogen heterocyclic molecules :
Quantitative Structure - Activity relationships in Aquatic
toxicology, J.O. Nriagu (ed.), John Wiley & Sons Inc., New-
York, 401-424.

SCHULTZ T.W., M. CAJINA-QUEZADA & J.N. DUMONT, 1980,
Structure toxicity relationships of selected nitrogenous
heterocyclic compounds,
Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9, 591-598.

SCHULTZ T.W., L.B. KIER & L.H. HALL, 1982,
Structure - Toxicity relationships of selected nitrogenous
heterocyclic compounds. III. Relations using molecular
Connectivity.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28, 373-378.

SCOGGINS M.W. & J.W. MILLER, 1968,
Rapid Separation technique for mono and disulfonic acids,
Anal. Chem., 40 (7), 1155-1157.

SHALER T.A. & G.M. KLECKA, 1986,
Effects of dissolved oxygen concentration on biodegradation of
2,4 - dichlorophenoxyacetic acid,
Appl. Environ. Microbiol., 51 (5), 950-955.

SHAW N., 1970,
Bacterial glycolipids,
Bacteriol. Rev., 34, 365-377.

SHISHKINA V.I., T.T. PROSHECHKINA & L.H. ZUBAREVA, 1970,
Structure and Chemical reactions of carbazole and its
derivatives. 34. Chlorosulfonation of carbazole,
Izv. Vyssh. Uch. Zav. Khim. Khim. Teknol., 13 (2), 269-270.

SHIVELY J.M. & A.A. BENSON, 1967,
Phospholipids of Thiobacillus thiooxidans,
J. Bacteriol., 94 (5), 1679-1683.

SHOHAM Y., & E. ROSENBERG, 1983,
Enzymatic depolymerization of Emulsan,
J. Bacteriol., 156 (1), 161-167.

SHOHAM Y., M. ROSENBERG & E. ROSENBERG, 1983,
Bacterial degradation of emulsan,
Appl. Environ. Microbiol., 46 (3), 573-579.

SHUKLA O.P. & P.K. BHATTACHARYYA, 1968,
Microbiological transformations of terpenes : Part XI -
Pathways of degradation of α - and β - pinenes in a soil
Pseudomonad (PL-Strain),
Indian J. Biochem., 5, 92-101.

SHUKLA O.P., M.N. MOHOLAY & P.K. BHATTACHARYYA, 1968,
Microbiological transformations of terpenes : Part X -
Fermentation of α -& β -pinenes in a soil Pseudomonad(PL-Strain),
Indian J. Biochem., 5, 79-91.

SIMS G.K., L.E. SOMMERS & A. KONOPKA, 1986,
Degradation of pyridine by Micrococcus luteus isolated from
soil,
Appl. Environ. Microbiol., 51 (5), 963-968.

SKOGMAN G.S. & J.E. SJÖSTRÖM, 1985,
Biosynthesis of 5 - hydroxy - L - tryptophan by a genetically
modified strain of Escherichia coli in presence of 5 -
hydroxyindole.
Biotechnol. Lett., 7 (11), 783-788.

SLATER J.H., & A.T. BULL, 1982,
Environmental microbiology : biodegradation,
Phil. Trans. Roy. Soc. London B, B297, 575-597.

SMITH P.F. & W.R. MAYBERRY, 1968,
Identification of the major glycolipid from Mycoplasma sp.
Strain J as 3, 4, 6 - triacyl - β - D - glucopyranose,
Biochemistry, 7 (8), 2706-2710.

SMYTH C.J., P. JONSSON, E. OLSSON, O. SÖDERLIND, J. ROSENGREN, S. HJERTEN & T. WADSTRÖM, 1978,
Differences in hydrophobic surface Characteristics of porcine enteropathogenic Escherichia coli with or without K88 antigen as revealed by hydrophobic interaction chromatography, Infec.Immunity, 22 (2), 462-472.

SPORTOL S., N. GJOS, R.G. LICHTENTHALER, K.O. GUSTAVSEN, K. URDAL, F. ORELD & J. SKEL, 1983.
Source identification or aromatic hydrocarbons in sediments using GC/MS, Environ. Sci. Technol., 17 (5), 282-286.

STEIERT J.G. & R.L. CRAWFORD, 1985,
Microbial degradation of chlorinated phenols, Trends Biotechnol., 3 (12), 300-305.

STEWART J.E., R.E. KALLIO, D.P. STEVENSON, A.C. JONES & D.O. SCHISLER, 1959,
Bacterial hydrocarbon oxidation. I . Oxidation of n-hexadecane by a Gram - Negative Coccus, J.Bacteriol., 78, 441-448.

STIRLING L.A. & J.J. PERRY, 1980,
Purification and properties of a Nicotinamide Adenine dinucleotide linked cyclohexanol dehydrogenase from a Nocardia species, Curr. Microbiol., 4, 37-40.

STIRLING L.A., R.J. WATKINSON & I.J. HIGGINS, 1977,
Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons : Isolation and properties of a cyclohexane - degrading bacterium, J. Gen. Microbiol., 99, 119-125.

STONG D.B. & D. WARSHAWSKY, 1983,
7H - dibenzo (c,g) carbazole metabolism in rat hepatocytes in Isolation, Characterization and use of hepatocytes, Harris R.A. and N.W. Cornell (eds), Elsevier Sciences Publishing Co, Inc., 373-378.

STRAY H., S. MANO, A. MIKALSEN & M. OEHME, 1984,
Slective determination of substituted PAH in aerosol using liquid CO₂ - Extraction, HPLC prefractionation on chemically activated silica, and HRGC combined with negative ion mass spectrometry, J. High Resolut. Chromatogr. & Chromatogr. Commun., 7, 74-82.

SUGAI T. & K. MORI, 1984,
Preparation of (R) - Ibuprofen and Related Carboxylic acids using microbial oxidation of an aromatic hydrocarbon by Rhodococcus sp. BPM 1613, Agr. Biol. Chem., 48 (10), 2501-2504.

SUGIYAMA S.I., K. YANO, H. TANAKA, K. KOMAGATA & K. ARIMA, 1958,
Metabolism of aromatic compounds by bacteria, I. Gentisic acid
oxidase and protocatechuic acid oxidase of Pseudomonas ovalis
S-5,
J. Gen. Appl. Microbiol., 4 (4), 223-240.

SUZUKI T., H. TANAKA & S. ITOH, 1974,
Sucrose lipids of Arthrobacteria, Corynebacteria and Nocardia
grown on sucrose,
Agr. Biol. Chem., 38 (3), 557-563.

SUZUKI T., H. TANAKA, I. MATSUBARA & S. KINOSHITA, 1969,
Trehalose lipid and α - branched - β - hydroxy fatty acid
formed by bacteria grown on n - alkanes,
Agr. Biol. Chem., 33 (11), 1619-1627.

SWISHER R.D., 1963,
Biodegradation of ABS in relation to chemical structure,
J. WPCF, 35 (7), 877-892.

SZEWZYK U., R. SZEWZYK & B. SCHINK, 1985,
Methanogenic degradation of hydroquinone and catechol via
reductive dehydroxylation to phenol
FEMS Microbiol. Ecol., 31, 79-87.

TADASA K. & H. KAYAHARA, 1983,
Initial steps of eugenol Degradation pathway of a
microorganism,
Agr. Biol. Chem., 47 (11), 2639-2640.

TASSIN J.P. & J.P. VANDECASTEELE, 1972,
Separation and characterization of long - chain alcohol
dehydrogenase isoenzymes from Pseudomonas aeruginosa,
Biochim. Biophys. Acta, 276, 31-42.

TAYLOR D.G. & P.W. TRUDGILL, 1978,
Metabolism of cyclohexane carboxylic acid by Alcaligenes strain
W I,
J. Bacteriol., 134 (2), 401-411.

TEMPEST D.W. & O.M. NEIJSSSEL, 1978,
Eco - physiological aspect of microbial growth in aerobic
Nutrient - limited Environments,
Adv. Microb. Ecol., 2, 105-153.

TONG H.Y. & F.W. KARASEK, 1984,
Quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel
exhaust particulate matter by high-resolution gas
chromatography,
Anal. Chem., 56 (12), 2129-2134.

TRUDGILL P.W., 1978,
Microbial degradation of alicyclic hydrocarbon in Developments
in biodegradation of Hydrocarbons, Walkinson R.J. (ed.), Applied
Sciences Publishers, London, 47 - 84.

TSACONAS C., P. PADIEU, G. MAUME, M. CHESSEBEUF, N. HUSSEIN & N. PITOIZET, 1986,
Gas chromatography-mass spectrometry of isobutyl ester trimethylsilyl ether derivatives of bile acids and application to the study of bile sterol and bile Acid biosynthesis in rat liver epithelial Cell lines,
Anal. Biochem., 157, 300-315.

TSUKAMOTO Y., S. NONOMURA & H. SAKAI, 1975,
Formation of cis- -menthan 1 -ol from menthane by Microbial Hydroxylation,
Agr. Biol. Chem., 39 (3), 617-620.

TSUKAMOTO Y., S. NONOMURA & H. SAKAI, 1977,
Isolation of a few metabolites from - menthane and conditions for cis - menthan- 1 -ol production by Pseudomonas mendocina - SF,
Agr. Biol. Chem., 41 (3), 435-444.

TULLOCH A.P., 1985,
Mass spectra of TMS esters of deuterated decanonic acids and of TMS Ethers of deuterated decanols,
Lipids, 20 (7), 404-411.

UMEZAWA T., F. NAKATSUBO & T. HIGUCHI, 1983,
Degradation pathway of arylglycerol- β -aryl ethers by Phanerochaete chrysosporium,
Agr. Biol. Chem., 47 (11), 2677-2681.

UNA G.V. & M.J.N. CARCIA, 1983,
Biodegradation of non - ionic dispersants in sea - water,
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., 18, 315-319.

VACHON V., J.T. Mc GARRITY, C. BREUIL, J.B. ARMSTRONG & D.J. KUSHNER, 1982,
Cellular and extracullular lipids of Acinetobacter lwoffii during growth on hexadecane,
Can. J. Microbiol., 28, 660-666.

VAN DER LINDEN A.C., 1963,
Epoxidation of β - olefine by heptane grown Pseudomonas cells ; Preliminary Notes,
Biochim. Biophys. Acta, 77, 157-159.

VAN DER LINDEN A.C. & R. HUYBREGTSE, 1969,
Occurrence of inducible and NAD(P)- independent primary alcohol dehydrogenases in an alkane - oxidizing Pseudomonas,
Antonie van Leeuwenhoek, 35, 344-360.

VAN EYK J. & T.J. BARTELS, 1968,
Paraffin oxidation in Pseudomonas aeruginosa, I. Induction of paraffin oxidation,
J. Bacteriol., 96, 706-712.

VAN RAVENSWAAY CLAASEN J.C. & A.C. VAN DER LINDEN, 1971,
Substrate specificity of the paraffin hydroxylase of
Pseudomonas aeruginosa,
Antonie Van Leeuwenhoek, 37, 339-352.

WAGNER F., BOCK, H., KRETSCHMER A., LANG S. & SYLDATK C., 1983,
Production and chemical characterization of surfactants from
Rhodococcus erythropolis and Pseudomonas sp. MUB grown on
hydrocarbons in Microbial enhanced oil recovery, Zajic J.E.,
D.G. Cooper, T.R. Jack and N. Kossaric (eds) Penwell
publishing, Tucson, 55-60.

WALKER J.D. & R.R. Colwell, 1976,
Enumeration of Petroleum - Degrading Microorganism,
Appl. Environ. Microbiol., 31 (2), 198-207.

WALKER J.D., R.R. Colwell & L. PETRAKIS, 1975,
Microbial petroleum degradation : application of computerized
mass spectrometry,
Can. J. Microbiol., 21, 1760-1767.

WALLE T. & H. EHRSSON, 1970,
Quantitative gas chromatographic determination of picogram
quantities of amino and alcoholic compounds by electron capture
detection. Part I. Preparation and Properties of the
heptafluorobutyryl derivatives,
Acta Pharm. Suec., 7, 389-406.

WANG Y.-T., M.T. SUIDAN & J.T. PFEFFER, 1984,
Anaerobic biodegradation of Indole to methane,
Appl. Environ. Microbiol., 48 (5), 1058-1060.

WARD D.M. & T.D. BROCK, 1978,
Hydrocarbon biodegradation in Hypersaline Environments,
Appl. Environ. Microbiol., 35 (2), 353-359.

WEST P.A., G.C. OKPOKWASILI, P.R. BRAYTON, D.J. GRIMES & R.R.
COLWELL, 1984,
Numerical Taxonomy of phenanthrene-degrading bacteria isolated
from the Chesapeake bay,
Appl. Environ. Microbiol., 48 (5), 988-993.

WESTLAKE DWS, A. JOBSON, R. PHILLIPPE & F.D. COOK, 1974,
Biodegradability and crude oil composition,
Can. J. Microbiol., 20, 915-928.

WIJAYARATNE R.D. & J.C. MEANS, 1984,
Sorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by natural
estuarine colloids,
Mar. Environ. Res., 11, 77-89.

WILLETTS A.J. & R.B. CAIN, 1972,
Microbial metabolism of alkylbenzene sulphonates ; Bacterial
Metabolism of undecylbenzene- p -sulphonate and dodecylbenzene
- p -sulphonate,
Biochem. J., 129, 389-402.

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
2. BIBLIOGRAPHIE	4
2.1. Le carbazole	5
2.1.1. Origine du carbazole	5
2.1.2. Description de la molécule de carbazole	6
2.1.3. Techniques de dosage du carbazole	6
2.1.4. Toxicité du carbazole	8
2.2. Voies du métabolisme bactérien	8
2.2.1. Les sources de carbone et d'azote	9
2.2.2. Catabolisme et anabolisme	10
2.3. Les métabolismes de dégradation des hydrocarbures	12
2.3.1. Métabolisme des alcanes et des alcènes chez les bactéries	12
2.3.1.1. En milieu aérobie	12
2.3.1.2. En milieu anaérobie	15
2.3.2. Métabolisme des cycloalcanes et des cycloalcènes	16
2.3.2.1. Oxydation des cycloalcanes et des cycloalcènes par les bactéries	17
2.3.2.2. Dégradation bactérienne des cycloalcanols et cycloalcanones	18
2.3.2.3. Dégradation des cycloalcanes et des cycloalcènes alkyl-substitués	18
2.3.2.4. Dégradation des acides naphténiques	19

2.3.3. Métabolisme des hydrocarbures aromatiques	21
2.3.3.1. Le benzène	21
2.3.3.2. Les monoalkylbenzènes	24
2.3.3.3. Les dialkylbenzènes	27
2.3.3.4. Les composés naphthaléniques	28
2.3.3.5. Les composés phénanthréniques et anthracéniques	31
2.3.3.6. Les hydrocarbures à 4 (ou plus) cycles aromatiques	35
2.3.3.7. Les composés phénoliques	37
2.3.3.8. Les phtalates	40
2.3.3.9. Les hydrocarbures azotés	40
2.3.3.9.1. L'aniline et ses dérivés	40
2.3.3.9.2. Les composés aromatiques nitro-substitués	43
2.3.3.9.3. Les hydrocarbures azotés hétérocycliques	44
2.3.3.9.4. Mécanisme théorique de dégradation du carbazole	46
2.4. Choix entre cultures pures et cultures mixtes dans l'étude de la biodégradation	47
2.4.1. Les cultures pures	47
2.4.2. Les cultures mixtes	48
2.5. Recherches et techniques de détermination de microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures	52
2.5.1. Sources des microorganismes	52
2.5.2. Adaptation des microorganismes à la source de carbone	53
2.5.3. Détection des microorganismes capables de dégrader la source de carbone	53
2.5.4. Isolement des souches capables de dégrader la source de carbone	54
2.5.5. Identification des souches capables de dégrader la source de carbone	55
2.6. Facteurs physico-chimiques influant sur la biodégradation	55
2.6.1. Influence du pH	55
2.6.2. Influence de la température	58
2.6.3. Influence de l'oxygène dissous	59
2.6.4. Influence de la source de carbone	60
2.6.5. Influence de la source d'azote	60

2.6.6.	Influence de la source de phosphore	60
2.6.7.	Influence de l'ionicté du milieu de culture	61
2.7.	Solubilisation des hydrocarbures dans l'eau	62
2.7.1.	Les tensioactifs bactériens	62
2.7.1.1.	Les glycolipides	63
2.7.1.1.1.	Les tréhalolipides	64
2.7.1.1.2.	Les sophorolipides	65
2.7.1.1.3.	Les rhamnolipides	65
2.7.1.2.	Les acides gras	66
2.7.1.3.	Les phospholipides	67
2.7.1.4.	Les antibiotiques	67
2.7.1.4.1.	La Gramicidine S	68
2.7.1.4.2.	Les polymyxines	68
2.7.1.4.3.	La Surfactine (Subtilysine)	68
2.7.1.4.4.	L'antibiotique TA	70
2.7.1.5.	Les Biopolymères	70
2.7.1.5.1.	Les biosurfactants de <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	70
2.7.1.5.2.	Autres biopolymères bactériens	72
2.7.1.6.	Les microorganismes ayant une surface cellulaire hautement hydrophobe	73
2.7.2.	Les tensioactifs de synthèse	74
2.7.2.1.	Action détergente	75
2.7.2.2.	Biodégradabilité des tensioactifs de synthèse	76
2.7.2.3.	Toxicité des tensioactifs de synthèse	76
2.7.3.	Solubilisation des hydrocarbures par voie chimique	78
2.7.3.1.	La chimie de la sulfonation	78
2.7.3.2.	Sulfonation du carbazole	85
2.7.3.3.	Biodégradation des hydrocarbures sulfonés	88

2.8. Techniques analytiques de détection des métabolites de dégradation et de suivi de biodégradation	93
2.8.1. Techniques d'analyses des hydrocarbures	94
2.8.1.1. Détermination de la composition des hydrocarbures	94
2.8.1.1.1. La chromatographie sur papier et sur couche mince	94
2.8.1.1.2. La chromatographie liquide	95
2.8.1.1.3. La chromatographie HPLC	96
2.8.1.1.4. La chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse	97
2.8.1.2. Techniques de suivi de la biodégradation des hydrocarbures	97
2.8.1.2.1. La chromatographie en phase gazeuse	97
2.8.1.2.2. La spectrophotométrie	99
2.8.2. Techniques d'analyses des métabolites	99
2.8.2.1. La chromatographie sur papier et sur couche mince	101
2.8.2.2. La chromatographie HPLC	101
2.8.2.3. La chromatographie en phase gazeuse	101
2.8.3. Techniques d'analyses des produits de dégradation purifiés	106
2.8.4. Techniques d'analyses enzymatiques	108
3. MATERIELS ET METHODES	110
3.1. Populations bactériennes	111
3.1.1. Populations autochtones	111
3.1.2. Souches pures	111
3.2. Le carbazole	112
3.3. L'acide carbazole monosulfonique	113
L'ultra-violet	113
L'analyse élémentaire C%, N%, H%	114

3.4. Les acides carbazole polysulfoniques	116
L'ultra-violet	117
L'infrarouge	117
Résonance magnétique nucléaire protonique	120
L'analyse élémentaire C%, N%, H%	120
3.5. Les tensioactifs	122
3.6. Les milieux de culture	122
3.6.1. Les rapports C/N/P	122
3.6.2. Les sources de carbone	123
3.6.3. La source d'azote	123
3.6.4. La source de phosphore	123
3.6.5. Les sels minéraux	123
3.6.6. Règle de préparation	123
3.7. Les méthodes analytiques	124
3.7.1. Les mesures de pH	124
3.7.2. La température	124
3.7.3. Les mesures d'absorption à 620 nm	125
3.7.4. Les mesures d'absorption en ultraviolet	125
3.7.5. Dosage colorimétrique des hétérocycles indoliques	125
3.7.6. Techniques de numération	127
3.7.6.1. Numération des bactéries autres que <i>Proteus vulgaris</i>	127
3.7.6.2. Numération de la bactérie <i>Proteus vulgaris</i>	128
3.7.7. Isolement et identification des bactéries	128
3.7.8. Traitement des échantillons avant analyses chromatographiques	129
3.7.8.1. Les échantillons de milieu de culture ayant le carbazole comme substrat	129
3.7.8.2. Les échantillons de milieu de culture ayant l'acide carbazole monosulfonique comme substrat	131

3.7.9. Les analyses chromatographiques	134
3.7.9.1. Dosage du carbazole par chromatographie en phase gazeuse : Technique CPG1	134
3.7.9.2. Dosage du carbazole par chromatographie en phase gazeuse : Technique CPG2	136
3.7.9.3. Dosage de l'acide carbazole monosulfonique	137
3.7.9.4. Techniques chromatographiques d'analyses qualitatives des produits de dégradation	138
3.7.9.5. Analyses quantitatives des métabolites par chromatographie HPLC	139
3.7.9.5.1. Les étalons	139
3.7.9.5.2. Les échantillons	141
4. SELECTION ET IDENTIFICATION DES BACTERIES	142
4.1. Objectif	143
4.2. Protocole	143
4.3. Résultats	143
4.4. Discussion	149
5. DYNAMIQUE DES CULTURES BACTERIENNES	151
5.1. Objectifs	152
5.2. Protocole	152
5.2.1. Evolution des croissances bactériennes	152
5.2.2. Dégradation des substrats	153
5.2.3. Evolution des caractéristiques des milieux au cours de la culture	155
5.2.4. Evolution du pH	155
5.3. Résultats : Aspects cinétiques des cultures	157
5.3.1. Evolution des croissances bactériennes	157
5.3.2. Dégradation des substrats	165
5.3.3. Evolution du pH	178

5.4. Discussion	189
5.4.1. Optimisation des milieux de culture	189
5.4.2. Evolution des cultures	192
5.4.2.1. Substrat carbazole	192
5.4.2.2. Substrat acide carbazole monosulfonique	193
5.4.3. Intérêt des tensioactifs P94 et P103	194
6. METABOLITES ISSUS DE LA BIODEGRADATION DU CARBAZOLE	196
6.1. Objectifs	197
6.2. Protocole	197
6.3. Résultats	198
6.3.1. Analyses quantitatives des échantillons	198
6.3.2. Analyses qualitatives des échantillons	201
6.4. Discussion	216
6.4.1. Dégradation des molécules présentes dans les milieux de culture	216
6.4.2. Production des métabolites détectés	219
6.4.3. Le matériel cellulaire	220
7. METABOLITES ISSUS DE LA BIODEGRADATION DE L'ACIDE CARBAZOLE MONOSULFONIQUE	222
7.1. Objectifs	223
7.2. Protocole	223
7.3. Résultats	224
7.3.1. Analyses qualitatives des échantillons	225
7.3.1.1. Echantillons des milieux de conditions C/N/P = 100/20/4	225
7.3.1.2. Echantillons des milieux de conditions C/N/P = 100/20/0,1	229

7.3.2. Analyses quantitatives des échantillons	233
7.3.2.1. Extrait au diméthylformamide	233
7.3.2.2. Evolution de la concentration en hétérocycles désorbés à la résine DUOLITE A378, lyophilisés et extraits au DMF	234
7.3.2.3. Concentrations en indole et en dérivés de l'indole dans les extraits au DMF	236
7.4. Discussion	237
7.4.1. Dégradation des molécules présentes dans les milieux de culture	238
7.4.2. Les produits de dégradation	238
7.4.2.1. Conditions de carence en carbone	238
7.4.2.2. Conditions de carence en phosphore	239
7.4.3. Le matériel cellulaire	241
8. CONCLUSION	244
9. BIBLIOGRAPHIE	250