

Remerciements

Ces travaux ont été menés au Centre de Pédologie Biologique-C.N.R.S dans le laboratoire des interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS). Ils se sont effectués dans le cadre d'un projet européen et d'un projet de recherche avec Rhône-Poulenc industrialisation.

Toute mon estime à Monsieur le professeur Ahmed Talouizte mon directeur de thèse. Je lui exprime vivement ma profonde gratitude pour l'intérêt qu'il a porté à ces travaux, sa confiance et ses encouragements qui m'ont permis de réaliser cette thèse.

Je remercie particulièrement Monsieur Jacques Berthelin ancien directeur du CPB-CNRS, directeur de recherche au LIMOS pour ses compétences et ses précieux conseils qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier Messieurs les professeurs Mohamed Benbella, Mohamed Ismaili et Michel Schiavon de m'avoir fait l'honneur de participer au jury et de juger ce mémoire.

Je remercie également tous mes collègues de RITTMO et plus particulièrement Madame Corinne Bitaud, directrice de RITTMO et Mademoiselle Laure Metzger, ingénieur de recherche pour leur soutien.

De même, je remercie tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à ce travail

A mon père à qui je dois tout, à ma mère qui m'a donnée le courage pour accomplir ce travail, qu'ils trouvent ici toute ma considération pour leur affection et leur soutien permanents.

A mes sœurs Sihame, Samira, Rajae, et mon frère Sidi Mohamed, à mes neveux Ali et Hamza, leur papa Fouad, à toute ma famille, mon petit univers, un grand merci pour leur soutien.

A ma très chère fleur Yasmine et son papa Djafar, merci pour sa patience et ses encouragements de tout instants.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I. Le sol	1
II. Les polluants organiques	1
II.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	2
II.2. Dégradation des HAP dans les sols	3
II.2.1. Dégradation des HAP par voie fongique.....	6
II.2.2. Dégradation des HAP par voie bactérienne	6
II.3. Bio-disponibilité des HAP dans les sols	8
II.4. Biodégradation des HAP dans la rhizosphère	8
Contexte de l'étude.....	9
CHAPITRE I : CARACTERISATION DU DEVENIR DES HYDROCARBURES POLYAROMATIQUES DANS LES SOLS : SIMULATION EXPERIMENTALE DES PROCESSUS D'ATTENUATION NATURELLE	12
Résumé.....	13
I. Introduction	16
I.1. Biodégradation des HAP	16
I.2. Facteurs influençant la biodégradation des HAP	18
I.3. Rétention des HAP aux constituants du sol	19
I.3.1. Effet du temps de contact polluant - sol	19
I.3.2. Effet des constituants minéraux du sol	20
I.3.3. Effet de l'eau du sol.....	21
I.3.4. Effet du pH du sol.....	21
I.3.5. Effet des constituants organiques du sol.....	22
II. Matériel et Méthodes	23
II.1. Les sols	23
II.1.1. Caractéristiques du sol industriel	23
II.1.2. Mise en solution des HAP dans l'eau « désorption »	24
II.2. Les polluants	24
II.3. Contamination et incubation des sols	25
II.3.1. Contamination des sols.....	25
II.3.2. Incubation des sols	25
II.4. Extraction et analyse des HAP dans les sols	25
II.4.1. Extraction des HAP.....	25
II.4.2. Analyse des HAP	26
II.5. Localisation des HAP dans le sol	27
II.5.1. Fractionnement d'agrégat à l'eau	27
II.6. Analyses microbiologiques	27
II.6.1. Dénombrement de la microflore bactérienne "totale"	27
II.6.2. Dénombrement de la microflore bactérienne dégradant les HAP	28
II.6.3. Expression des résultats	29
III. Résultats	30
III.1. Propriétés physico-chimiques du sol industriel	30
III.1.1. Teneur en Carbone et en azote	30
III.1.2. Caractérisation de la rétention des HAP par le sol industriel.....	30
III.1.2.1. Sol avant fractionnement.....	31
III.1.2.2. Fractions granulométriques du sol	32
III.2. Devenir des HAP dans les sols	33
III.2.1. Etude comparative entre un sol industriel et un sol artificiellement contaminé	34
1) Localisation des HAP dans les fractions d'agrégats des sols.....	34

2) <i>Dénombrement des communautés bactériennes (totales et dégradantes)</i>	39
3) <i>Etude à l'échelle ultra-structurale des sols contaminés par les HAP</i>	44
III.2.2. <i>Rôle de certaines caractéristiques des sols dans la dissipation des HAP</i>	45
1) <i>Biodisponibilité des HAP dans un sol sableux incubé en microcosme</i>	46
2) <i>Dissipation des HAP dans un sol riche en matière organique</i>	50
IV. Discussions	57
IV.1. Sol industriel pollué	58
IV.1.1. <i>Etude de la localisation des HAP et des microorganismes responsables de la</i> <i>biodégradation</i>	58
IV.1.2. <i>Effet du mode d'incubation du sol industriel sur la biodégradation des HAP</i>	59
IV.1.3. <i>Essai de définition des relations entre extractabilité et biodégradabilité des HAP</i>	60
IV.2. Sols contaminés artificiellement	61
IV.2.1. <i>Comportement des HAP durant le vieillissement de la contamination des sols</i>	62
IV.2.2. <i>Comportement des microorganismes dans les sols contaminés par des HAP</i>	65
IV.2.3. <i>Effet de la structure du sol et de la teneur en MO sur le devenir des HAP</i>	67
V. Conclusion	69

CHAPITRE II : ETUDE DES PHENOMENES DE STABILISATION DES HYDROCARBURES

POLYAROMATIQUES DANS LES SOLS ET COMPETITION AVEC LES BACTERIES DEGRADANTES ... 70

I. Introduction	73
I.1. Bioaccessibilité des hydrocarbures polyaromatiques	73
I.2. Piégeage physique des HAP au sein des agrégats	74
I.3. Stabilisation des HAP dans les sols	75
I.4. Objectif de l'étude	76
II. Matériel et Méthodes	77
II.1. Communautés bactériennes dégradantes	77
II.1.1. <i>Isolement et capacité dégradante des bactéries</i>	77
a) <i>Isolement bactérien</i>	77
b) <i>Capacité à dégrader des contaminants organiques</i>	77
II.1.2. <i>Caractérisation morphologique des isolats bactériens</i>	78
II.1.3. <i>Identification des souches bactériennes isolées</i>	78
II.1.4. <i>Choix et caractérisation d'une bactérie dégradante</i>	78
1) <i>Dégradation du phénanthrène par la souche NAH1</i>	79
2) <i>Minéralisation du phénanthrène par la souche NAH1</i>	79
II.2. Biodégradation des HAP	80
II.2.1. <i>Sols</i>	80
II.2.2. <i>Incubations en batch des agrégats contaminés</i>	80
II.3. <i>Incubations des sols en présence d'HAP marqué au ¹⁴C</i>	80
II.3.1. <i>Le polluant organique utilisé</i>	81
II.3.2. <i>Contamination des sols et mise en place des incubations</i>	81
II.3.3. <i>Minéralisation du carbone organique total</i>	82
II.3.4. <i>Devenir du ¹⁴C-phénanthrène dans le sol</i>	82
II.3.5. <i>Dénombrement des communautés bactériennes</i>	83
III. Résultats	85
III.1. Nature et caractérisation des populations dégradantes dans un sol contaminé par les HAP	85
III.1.1. <i>Isolement, identification et caractérisation des bactéries dégradantes</i>	85
III.1.2. <i>Caractérisation d'une souche bactérienne dégradante</i>	87
III.1.2.1. <i>Dégradation du phénanthrène par la souche NAH1 Burkholderia sp.</i>	89
III.1.2.2. <i>Minéralisation du ¹⁴C-phénanthrène en culture pure</i>	89
III.2. Etude des processus de stabilisation/biodégradation des HAP dans les sols contaminés	90
III.2.1. <i>Interaction des agrégats du sol avec les HAP</i>	91
III.2.2. <i>Bio-disponibilité et biodégradabilité du phénanthrène apporté aux sols expérimentaux</i>	92

III.2.2.1. Minéralisation du ¹⁴ C-PHE dans un sol sous l'influence de la microflore inoculé et autochtone au cours du vieillissement de la contamination.....	93
III.2.2.2. Croissance des communautés bactériennes dans le sols contaminés	94
III.2.3. Rôle de la matière organique du sol dans la stabilisation du phénanthrène et la formation des résidus non extractibles.....	94
III.2.3.1. Minéralisation du carbone organique total	94
III.2.3.2. Stabilité du phénanthrène dans les fractions organiques du sol.....	95
III.2.4. Effet de l'inoculation et d'un surfactant sur la bio-disponibilité du ¹⁴ C-phénanthrène.....	97
III.2.4.1. Minéralisation et dissipation du ¹⁴ C-phénanthrène.....	97
III.2.4.2. Minéralisation de la matière organique.....	99
III.2.4.3. Communautés bactériennes dégradantes.....	100
IV. Discussion.....	101
IV.1. Nature des populations bactériennes dégradantes au sein des agrégats de sol contaminé	101
IV.2. Interactions polluant – adsorbant (phénanthrène – agrégat).....	102
IV.3. Effet de la minéralisation de la matière organique sur le devenir du ¹⁴ C-phénanthrène	104
IV.4. Effet de l'inoculation d'une bactérie dégradante sur le devenir du ¹⁴ C-phénanthrène	105
IV.5. Rôle de la fraction acides humiques et acides fulviques dans la formation de résidus liés	107
IV.6. Effet du surfactant sur la minéralisation du ¹⁴ C-phénanthrène par la souche inoculée	108
IV.7. Effet de l'apport de nutriments sur la minéralisation du ¹⁴ C-phénanthrène.....	108
V. Conclusion.....	109
CHAPITRE III : DEGRADATION DES HYDROCARBURES POLYAROMATIQUES SOUS L'EFFET DES CONTRAINTES NUTRITIONNELLES SIMULANT LA RHIZOSPHERE DES PLANTES	111
I. Introduction	113
I.1. Biotransformation des HAP dans la rhizosphère	113
I.2. Effet de la rhizosphère sur la dissipation des HAP.....	114
I.3. Objectif de l'étude	115
II. Matériel et Méthodes.....	116
II.1. Sol étudié.....	116
II.2. Dispositif expérimental.....	116
II.3. Solution nutritive d'exsudats racinaires.....	116
II.4. Analyses	117
II.5. Dénombrement des bactéries dégradantes.....	117
III. Résultats	117
IV. Discussion.....	117
IV.1. Dégradation des HAP dans dispositifs en colonnes simulant la rhizosphère	117
IV.2. Effet des éléments nutritifs (C/N/P) sur la dégradation des HAP	117
V. Conclusion.....	119
CONCLUSION	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

INTRODUCTION

I. Le sol

Le sol présente une très grande diversité de structure, de texture et d'activité biologique, ce qui lui permet de transformer un grand nombre de débris et de déchets en composés organiques et minéraux et ainsi de recycler les ressources dont dépend la vie sur notre planète.

Le sol est un milieu idéal pour la vie des microorganismes, et aucun autre milieu naturel ne peut supporter une si grande diversité biologique dans une même échelle de temps et d'espace. Il représente un milieu qui peut être favorable pour leur croissance. En effet, un sol influence fortement la croissance de ces microorganismes par son état hydrique, sa composition minérale et organique, sa teneur en oxygène, sa température et son pH. Les constituants du sol possèdent une très grande surface spécifique, une hétérogénéité de composition, de taille des particules et de nature des constituants organiques et inorganiques. La complexité des sols et leur hétérogénéité à petite échelle, qui créent une multitude de niches microbiennes différentes, font que les microorganismes du sol et les processus qui s'y déroulent sont mal connus. Par opposition avec sa proximité et le rôle essentiel qu'il joue pour la vie humaine, le sol demeure un milieu relativement peu connu par bien des aspects.

Les sols ont subi divers effets d'anthropisation depuis des milliers d'années, et le peu de connaissance des processus qui s'y déroulent a eu des conséquences néfastes pour leur conservation à l'état naturel. Aujourd'hui, la connaissance des processus de dégradation des polluants dans les sols est meilleure qu'hier, mais elle est loin d'être optimale.

Les polluants organiques sont largement répandus dans les sols de friche industrielle, dont la persistance, liée à leur faible mobilité et bio-disponibilité, représente un risque néfaste d'une importance capitale pour la protection de l'environnement et l'utilisation future des sites pollués.

II. Les polluants organiques

Les polluants organiques renferment une large gamme de composés qui peuvent être classés selon leur origine (pesticides, carburants, explosifs, résidus de l'industrie pétrolière, déchets issus de la production de coke, etc...), leur structure chimique (hydrocarbures, diphényles polychlorés : PCB, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), benzène/toluène/ethylbenzène/xylène (BETX), dioxines...) ou selon leur propriétés chimiques ou physiques (liquides non aqueux, composés organiques volatiles). En plus de ces polluants

d'origine industrielle, d'autres résidus organiques d'activité humaine peuvent également constituer des sources de problèmes environnementaux (restes ménagers, boues de station d'épuration, fumiers, lisiers, etc...). Pour tous ces polluants, la dégradation biologique en composés et éléments non toxiques (CO_2 , H_2O , N, P, etc ...) constitue la solution ultime.

II.1. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des molécules organiques constituées de l'association d'au moins deux cycles benzéniques (figure 1). Les HAP constituent un groupe très varié de composés organiques persistants et ubiquistes, qui sont parmi les polluants auxquelles la Communauté Européenne et l'Agence pour la Protection de l'Environnement (Etats Unis) accordent une importance prioritaire.

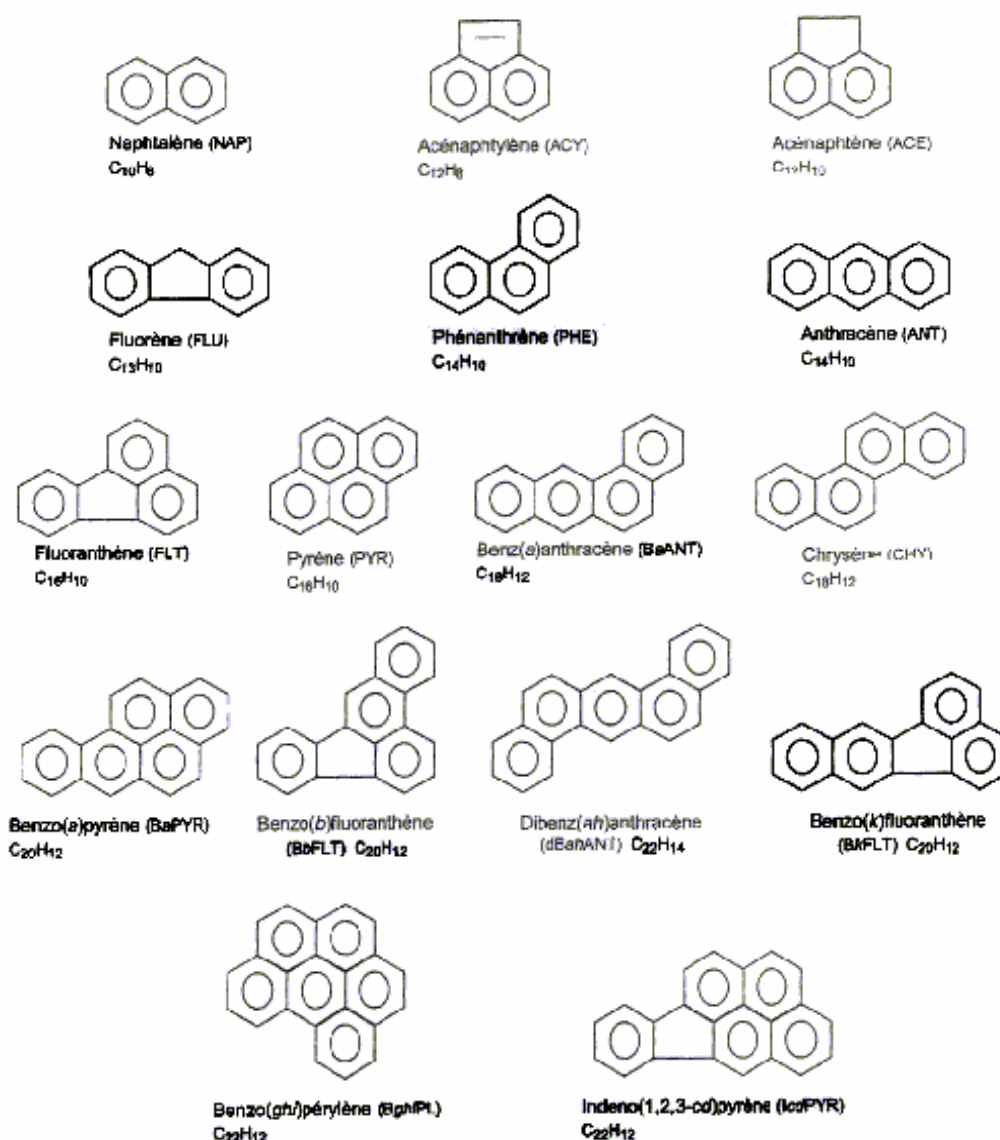


Figure 1 : Formules structurales des HAP retenus comme polluants répandus dans les échantillons environnementaux.

Ce groupe de composés (figure 1) a été retenu pour être étudié car ses molécules présentent des niveaux différents de dégradation. En effet, certains sont rapidement dégradés par des microorganismes comme source directe de carbone. D'autres composés sont hautement persistants et ne peuvent être dégradés que par co-métabolisme. Du fait de leur caractère hydrophobe, ces molécules ont tendance, comme certains pesticides, à interagir avec différents colloïdes du sol, plus particulièrement les régions hydrophobes de la matière organique avec lesquelles ils peuvent former des liaisons plus au moins stables et ainsi persister dans l'environnement (Hartmann, 1996 ; van Brummelen et al., 1996)

La présence des HAP dans l'environnement a deux origines :

-une origine naturelle, par l'intermédiaire de processus géologiques associés à la formation de combustibles fossiles mais aussi lors des incendies de forêts, de prairies et durant les activités volcaniques (Wilson et Jones, 1993).

-une origine anthropique, la source essentielle provient des activités industrielles nécessitant l'utilisation des combustibles fossiles, les usines d'incinérations mais aussi d'activités humaines quotidiennes comme le chauffage au fuel ou les émissions des gaz d'échappement des véhicules (Tremolada et al., 1996). Si on retrouve donc principalement les HAP dans les sols à proximité des sites industriels, les sols agricoles peuvent aussi être contaminés par ces polluants lors d'épandage de boues de stations d'épurations (Wild et al., 1992).

Les problèmes posés par la présence de ces composés dans l'environnement sont liés à leur effet nocif pour la santé humaine du fait de leur fort pouvoir cancérigène et mutagène.

II.2. Dégradation des HAP dans les sols

Le devenir des HAP dans les sols comporte plusieurs voies. Du fait de leur faible solubilité dans l'eau, une faible fraction se trouve dans la solution du sol, mais certains composés organiques dissous peuvent augmenter cette concentration. Certains comme le naphthalène, sont volatiles en fonction de l'aération du sol. Les HAP localisés dans les horizons de surface peuvent être dégradés par photolyse. Ils peuvent également être liés aux constituants du sol par des interactions hydrophobes. Les HAP persistent alors dans les sols sous forme de résidus liés et constituent un risque de pollution à long terme car ils sont susceptibles d'être relargués dans la solution du sol. Cependant, la persistance des HAP dans le sol sera également fonction de leur temps de demi-vie, lequel est plus important pour les HAP les plus lourds donc les moins solubles (tableau 1). Enfin, comme cela sera développé par la suite, ils peuvent être dégradés par les microorganismes du sol.

Tableau 1 : propriétés chimiques et physiques des HAP

Composés	Nbre de cycles	Masse moléculaire	log Kow	Solubilité dans l'eau (mg/l)	Demi-vie (jour ou an)
Naphtalène	2	128	3,37	31,7	16-48j
Anthracène	3	178	4,45	0,073	50j-1,3a
Fluorène	3	166	4,18	1,98	32-60j
Phénanthrène	3	178	4,46	1,29	16-200j
Fluoranthène	4	202	5,33	0,26	140j-1,2a
Pyrène	4	202	5,32	0,135	210j-5,2a
Chrysène	4	228	5,61	0,002	1-2,7a
Benz[a]anthracène	4	228	5,61	0,014	102j-1,9a
Benzo[a]pyrène	5	252	6,04	0,0038	57j-1,5a
Benzo[b]fluoranthène	5	252	6,57	0,0012	360j-1,7a
Benzo[k]fluoranthène	5	252	6,84	0,00055	2,5-5,9a
Dibenz[a,h]anthracène	5	278	5,97	0,0005	361j-2,6a
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	6	276	7,23	0,062	1,6-2a
Benzo[g,h,i]pérylène	6	276	7,66	0,00026	0,25-1,8a

Kow est le coefficient de partage octanol-eau caractérisant l'hydrophobicité des HAP.

Le devenir des HAP dans les sols dépend d'un ensemble de processus responsables de la volatilisation, de l'immobilisation, de la mise en solution, du transport et des transformations chimiques et biochimiques des molécules. Ainsi, la mobilité des HAP dans les sols fait intervenir les phénomènes suivants :

- **La solubilisation**, qui implique un transfert des polluants vers la phase aqueuse. La solubilité peut être fonction de la structure chimique, de la polarité, de la masse atomique et de l'encombrement de la molécule. Elle joue un rôle important dans la détermination du degré de dispersion et de migration des contaminants ainsi que leur degré d'exposition aux microorganismes responsables de la dégradation biologique. La faible solubilité de la plupart des HAP limite donc leur migration en profondeur et plus particulièrement vers les eaux souterraines, mais entrave les travaux de biodépollution en rendant les polluants peu accessibles aux microorganismes.
- **La percolation**, qui consiste en l'entraînement par l'eau de pluie dans le sol, des composés les plus facilement solubles, vers la profondeur, voir jusqu'aux nappes phréatiques.
- **L'adsorption**, qui consiste en la rétention plus au moins réversible du polluant au niveau de la matrice solide. L'adsorption fait intervenir des phénomènes assez complexes aboutissant à plusieurs types de liaisons adsorbant/polluant (Barriusso et al., 1996 ; Guerrin et Boyd, 1997). Les caractéristiques de la molécule organique (structure, taille,...), la nature du sol (taux et maturation de la matière organique, acides humiques,...), l'eau contenue dans le sol et les

facteurs environnementaux (pH, température, ...) peuvent influencer les mécanismes d'adsorption /désorption (Martins, 1993; Bayard, 1997). Dans le cas des HAP, ces phénomènes sont d'autant plus importants que les molécules sont complexes.

- **La volatilisation**, qui implique un transfert des composés du sol vers la phase gazeuse et éventuellement jusqu'à l'atmosphère. Ce phénomène n'est théoriquement significatif que pour les HAP à 2 ou 3 cycles aromatiques.

- **La migration des phases liquides non aqueuses (PLNA)**, dans le cas d'une pollution massive par des phases goudroneuses. Leur migration verticale peut être rapide et relativement indépendante de la dynamique de l'eau du sol. Elle dépend de leur densité, de leur viscosité, de la perméabilité du sol et des propriétés de mouillabilité des surfaces des constituants du sol.

De façon générale, l'augmentation des phénomènes de rétention sur la phase solide provoque la diminution des risques de dispersion du polluant, mais rend plus difficile son élimination complète.

Une part importante des phénomènes gouvernant le devenir des HAP dans les sols dépend donc du milieu récepteur (propriétés physico-chimiques et microbiologiques).

Face aux risques que représentent les HAP pour la santé, le problème de la réhabilitation des sites contaminés et donc de la destruction des HAP, s'est posé. Un traitement physico-chimique d'incinération, consistant en la combustion des déchets organiques à haute température est utilisé, mais il est lourd et coûteux. Aussi des techniques de bio-dépollution se sont développées. Elles sont essentiellement axées sur une approche microbiologique, dans laquelle on sélectionne des espèces présentant le meilleur potentiel de dégradation des HAP, et une approche écologique, dans laquelle on ajuste les paramètres physico-chimiques du sol permettant une dégradation efficace des polluants (Ritter et Scarborough, 1995).

Les HAP peuvent être oxydés par les microorganismes du sol selon deux voies : voie bactérienne et voie fongique.

II.2.1. Dégradation des HAP par voie fongique

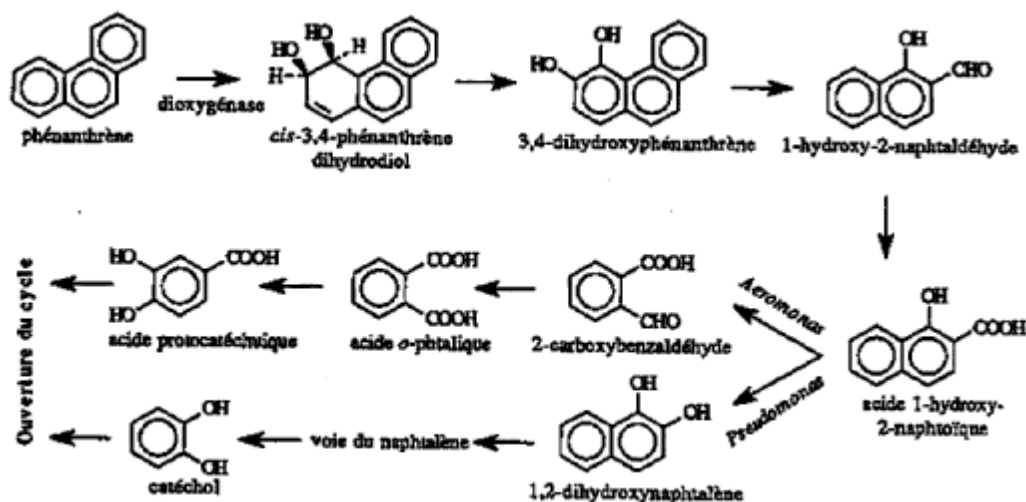
Les systèmes enzymatiques des champignons impliqués dans la dégradation des HAP sont différents selon qu'on soit en présence d'un champignon filamenteux ou lignolytiques. Les premiers, possèdent un système enzymatique intra-cellulaire de type monooxygénase et ne peuvent utiliser les HAP comme unique source de carbone et d'énergie (Cerniglia, 1997). Les seconds, impliquent des enzymes extra-cellulaires de types peroxydase qui sont peu spécifiques, elles peuvent dégrader d'autres composés organiques présentant une analogie

avec la lignine (Field et al., 1993 ; Barr et Aust, 1994). Comme les champignons inférieurs, ils ne peuvent dégrader les HAP en les utilisant comme unique source de carbone. Cependant, leur activité enzymatique extra-cellulaire leur confère un avantage indéniable sur les bactéries en ce qui concerne la dégradation des HAP peu ou pas bio-disponibles. Malgré cela, les champignons ne semblent pas dégrader ou minéraliser les HAP aussi rapidement que les bactéries (Cerniglia, 1997), la dégradation serait même incomplète et une association avec les bactéries serait nécessaire pour une minéralisation totale (Kotterman et al., 1998).

II.2.2. Dégradation des HAP par voie bactérienne

Les étapes de dégradation par voie bactérienne sont bien décrites, la première étape consiste en l'addition dans un cycle aromatique de deux atomes d'oxygène. Cette réaction est catalysée par une enzyme de type dioxygénase (Fan et Krishnamurthy, 1995). Le composé formé subit ensuite une série de transformations jusqu'à un métabolite intermédiaire, souvent le catéchol. Le catéchol est à son tour dégradé selon deux voies de clivage dites en meta et en ortho ce qui conduit à une ouverture du cycle aromatique et à la formation de composés simples, tels le pyruvate ou le succinate, qui sont utilisés comme source d'énergie par les microorganismes (Wilson et Jones, 1993).

De nombreuses souches bactériennes, appartenant à des genres différents, isolées de sols contaminés par des HAP, présentent des aptitudes différentes à dégrader ces composés. Cependant, les bactéries les plus utilisées dans les travaux de bio-remédiation appartiennent au genre *Pseudomonas*.



Schémas : Voies bactériennes de dégradation du phénanthrène (Cerniglia, 1992).

La biodégradation des HAP légers a été largement étudiée. La biodégradation des HAP a plus de 4 cycles par des bactéries du sol a été décrite récemment. Cette dégradation nécessite souvent la présence dans le milieu de culture d'une source de carbone supplémentaire « mécanisme de cométabolisme ». Cependant, de nombreuses études décrivent l'utilisation, comme unique source de carbone et d'énergie, des composés à plus de 4 cycles comme le Pyrène (Kärstner et al., 1994 ; Juhasz et al., 1997), le Chrysène (Cenci et Caldini, 1997), le Benzo(a)pyrène et le diBenz(a,h)anthracène (Juhasz et al., 1997). Néanmoins, les bactéries semblent dégrader plus efficacement et plus rapidement les composés à 3 cycles par rapport aux composés plus lourds (Goyal et Zylstra, 1997). Les différences de dégradation sont en grande partie dues à la solubilité des HAP. Certaines souches de *Pseudomonas* et de *Flavobacterium* sont capables d'utiliser uniquement les HAP les plus solubles dans l'eau (Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995). C'est pour cette raison que de nombreuses recherches s'intéressent à la production de biosurfactant par les bactéries dégradantes, afin d'augmenter la disponibilité des HAP vis à vis de ces bactéries (Arino et al., 1996 ; Burd et Ward, 1996 ; Deziel et al., 1996).

La biodégradation des HAP dépend également d'autres facteurs environnementaux tel que le pH, la température, l'humidité, l'aération et le potentiel redox dont les valeurs influencent l'activité microbienne. La présence d'autres contaminants, comme les métaux lourds, toxiques pour les micro-organismes du sol sont également impliqués dans cette biodégradation (Wilson et Jones, 1993 ; Bouwer et Zehnder, 1993).

II.3. Bio-disponibilité des HAP dans les sols

Le sol est un système hétérogène multiphasique, constitué d'agrégats de différentes tailles granulométriques. Le devenir des molécules organiques polluantes tel que les HAP dans les sols dépend de leur accessibilité et de leur biodégradation, qui elle même est conditionnée par l'activité des microorganismes présents. L'activité de ces microorganismes *in situ* est affectée par la structure et la texture du sol, la nature et la concentration des nutriments, et l'accessibilité des polluants.

L'accessibilité des polluants est un processus qui est aujourd'hui invoqué pour expliquer la persistance de ces polluants organiques dans les sol et leur protection par la matrice solide du sol (Alexander, 1999). Cette protection peut être chimique, par adsorption sur les minéraux du sol (Scow et Johnson, 1997 ; White et al., 1997), ou physique, du fait de la localisation dans la

matrice solide. La matrice solide du sol est en effet un milieu triphasique (solide, liquide, gazeux), cloisonné, dans lequel les conditions physiques, chimiques et biologiques sont très variables spatialement, même à des échelles fines d'organisation (de l'ordre du mm). Les polluants organiques (HAP) y seraient protégés, car non accessibles physiquement aux microorganismes compétents (Nam et Alexander, 1998), ou du fait de conditions physiques localement défavorables. Les phénomènes de protection physique sont susceptibles d'être d'autant plus importants que les composés organiques sont distribués de manière hétérogène dans le sol.

La protection physique fait l'objet de nombreuses études actuelles pour expliquer le devenir des matières organiques naturelles des sols (Besnard et al., 1996. Angers et Chenu, 1997 ; Balesdent et al., 2000) et les mêmes mécanismes semblent pouvoir expliquer le devenir des polluants organiques (HAP) dans les sols.

II.4. Biodégradation des HAP dans la rhizosphère

La rhizosphère constitue un écosystème particulier dont les propriétés physico-chimiques (pH, humidité, potentiel redox, température) diffèrent de celles du sol mais varie en fonction de l'espèce végétale. La présence des racines qui exsudent dans le milieu de nombreux composés hydrosolubles favorise le développement des microorganismes dans la rhizosphère. La diversité de ces microorganismes dépend de leur localisation dans la rhizosphère, alors que leur densité varie en fonction de la quantité et la qualité des substrats excrétés.

L'utilisation des plantes a été envisagée depuis quelques années dans les techniques de biodépollution des sites contaminés, comme une méthode peu coûteuse pour accroître le développement et l'activité des microorganismes dégradant les polluants organiques tels les HAP. Afin de pouvoir utiliser les plantes comme outil de biodégradation des HAP, il était important au préalable de s'intéresser à leur développement dans un sol contaminé par ces polluants. *In situ*, des épandages de HAP sur des plantes agricoles se sont traduits par une diminution du pourcentage de germination, des retards de croissance et des diminutions de rendement (Chaineau et al., 1996). Par ailleurs, la capacité des plantes, notamment les plantes agricoles, à augmenter la dégradation de nombreux polluants organiques, y compris les HAP est bien connue. La plupart de ces plantes sont des monocotylédones (Anderson et al., 1993). Les études de biodégradation des HAP dans la rhizosphère que ce soit en laboratoire (Schwab et Banks, 1994 ; Günther et al., 1996 ; Reilley et al., 1996), ou au champs (Qiu et al., 1994)

ont été réalisées avec des graminées comme le ray-grass, considéré comme étant efficace grâce à la qualité des exsudats racinaires.

L'augmentation de la biodégradation des HAP dans la rhizosphère serait la conséquence du développement d'une microflore dégradante grâce aux composés libérés dans le milieu par les racines (Schwad et Banks, 1994 ; Walton et al., 1994 ; Reilley et al., 1996). Cependant, si l'augmentation de l'activité microbienne dans la rhizosphère en présence de HAP a été démontrée (Qiu et al., 1994, Günther et al., 1996), la présence d'une microflore utilisant les HAP comme unique source de carbone et d'énergie a été peu étudiée. Une autre hypothèse, expliquant la disparition des HAP dans la rhizosphère, considère que ces composés ne sont plus forcément minéralisés, mais immobilisés sous forme de résidus liés non-extractibles. Walton et al. (1994) ont montré que des quantités de HAP (naphtalène, phénanthrène, et fluorène) piégées par des acides fulviques et humiques étaient plus importantes dans un sol rhizosphérique par rapport à un sol non rhizosphérique.

Ainsi, si les plantes présentent de réelles capacités à diminuer le stock de HAP dans un sol, les mécanismes impliqués et le rôle exact des exsudats racinaires et des différents microorganismes de la rhizosphère restent encore à approfondir.

Contexte de l'étude

La pollution des sols et des sous-sols résulte des conséquences cumulées au cours du temps des diverses activités humaines (industrielle, agricole, urbaine, etc.) Cette contamination, négligée jusqu'à une époque relativement récente, est préoccupante par ces conséquences sanitaires, environnementales et socio-économiques. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont au cœur des préoccupations à cause du caractère cancérigène et mutagène de certains d'entre eux et d'autre part à cause du nombre important de sites pollués. La prédiction du comportement et du devenir des HAP est un des problèmes auxquels se confrontent de nombreux scientifiques.

Si les microorganismes apparaissent comme un outil possible de bio-remédiation des sols contaminés par les HAP, de nombreuses questions subsistent notamment en ce qui concerne le devenir des HAP à fort poids moléculaire, la répartition des HAP dans différents compartiments du sol et le rôle de différentes composantes biologiques du sol.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour objectifs de :

- préciser le devenir d' HAP de 3 à 6 cycles dans différents types de sol.
- déterminer les paramètres contrôlant la bio-accessibilité des HAP dans le sol.
- évaluer la part des mécanismes de dégradation, d'adsorption dans la diminution de la teneur des HAP.
- préciser le rôle des microorganismes, en particulier les bactéries dans le devenir des HAP.

Pour établir la faisabilité et mener à bien des traitements biologiques des sols conduisant à la biodégradation des polluants organiques et leur minéralisation, il y a lieu (i) de proposer des voies d'approche pour déterminer la bio-accessibilité et (ii) de définir les paramètres importants favorables, améliorant cette bio-accessibilité et accélérant la biodégradation des polluants organiques.

Dans le chapitre I, l'étude porte sur la recherche et la définition de paramètres déterminant la bio-accessibilité en répondant à quelques questions relatives à la nature, la localisation et la mobilité des polluants (HAP) et à la présence, la localisation et l'activité potentielle des microorganismes (bactéries) impliqués dans la biodégradation des HAP.

La plupart des recherches concernant la biodégradation des HAP ont étudié une seule molécule de HAP dans un système très simplifié afin de minimiser le nombre de variables. Cependant, les interactions entre substrat doivent être considérées dans les stratégies de bio-remédiation puisque les HAP sont généralement présents en mélange dans des conditions environnementales complexes.

C'est pour cette raison que les démarches expérimentales adoptées lors de cette étude consistaient à étudier dans un premier temps la biodégradation et le devenir d'un mélange de 8 molécules de HAP dans plusieurs types de sols (sol naturels contaminés et sol industriel) incubés en microcosme sous des conditions expérimentales simulant l'atténuation naturelle.

Les résultats de cette partie de l'étude ont fait l'objet de publications scientifiques jointes dans le chapitre en documents complémentaires

Dans le chapitre II, sont étudiés la biodégradation des HAP et les paramètres de l'activité biodégradante des microorganismes. Les relations entre la localisation des HAP et des microorganismes d'une part, et certains compartiments ou constituants (argiles, matières organiques) des sols d'autre part, sont privilégiées. Les facteurs favorables accélérant la biodégradation sont étudiés en vue d'améliorer les performances d'un ou des traitements biologiques associés ou non à des traitements physiques ou physico-chimiques.

Afin d'élucider et de préciser les mécanismes qui contrôlent la bio-disponibilité et la biodégradation des HAP nous avons utiliser des agrégats séparés ou bien le sol total incubés avec le phénanthrène choisi comme molécule d'étude sous des incubations en batch où les paramètres physico-chimiques et microbiologiques peuvent être à la fois modifiés et contrôlés.

Les résultats de cette partie de l'étude ont également fait l'objet de publications scientifiques jointes dans le chapitre en documents complémentaires.

Dans le chapitre III, est étudié l'effet de la rhizosphère sur la dissipation d'HAP, dans un sol industriel pollué, en simulant les conditions rhizosphériques. Le comportement des microorganismes autochtones dégradants vis à vis des HAP dans ce sol industriel pollué a été également étudié.

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie de l'étude a fait l'objet d'une publication scientifique jointe dans le chapitre en document complémentaire.

CHAPITRE I :

***Caractérisation du devenir des hydrocarbures polyaromatiques dans
les sols : Simulation expérimentale des processus d'atténuation
naturelle***

Résumé

Le comportement des contaminants organiques, comme les hydrocarbures polyaromatiques (HAP) dans les sols et les eaux de surface fait intervenir des paramètres physiques, physico-chimiques et biologiques. En raison de leur biodégradabilité, les phénomènes biotiques et physico-chimiques jouent un rôle fondamental. La bioremediation *in situ* fait appel soit à la stimulation des communautés microbiennes existantes qui ont un fort potentiel de dégradation des HAP soit à l'inoculation d'espèce possédant des capacités métaboliques dégradantes spécifiques vis à vis de ces polluants organiques. Cependant, la vitesse de biodégradation des HAP dans un environnement aussi complexe que le sol est généralement limitée comparativement à celle observée à l'échelle du laboratoire.

Afin d'expliquer les mécanismes et de définir les paramètres impliqués dans ces phénomènes, une étude a été tout d'abord menée sur un sol industriel contaminé pour déterminer la localisation et la distribution des HAP et des bactéries dégradants ces HAP au sein de différentes classes d'agrégats du sol. L'estimation des bactéries dégradantes par la méthode NPP en microplaque indique que ces bactéries dégradantes sont plus nombreuses dans les agrégats de la taille des limons fins (2-20 μm) et des argiles (< 2 μm) comparés aux fractions des agrégats les plus larges et au sol avant fractionnement granulométrique. Les teneurs en HAP sont également élevées dans les agrégats fins correspondant aux limons fins. Des résultats similaires sont trouvés dans un sol (sol de Bellefontaine) contaminé artificiellement (après 6 mois d'incubation en microcosme) et qui présente des caractéristiques physico-chimiques proches du sol industriel. Des observations au microscope électronique à transmission montrent que les bactéries « autochtones » sont piégées dans les agrégats où les HAP sont très abondants. Cette co-localisation indique que des facteurs autres que la capacité à dégrader les HAP, contrôlent la vitesse de dégradation des HAP dans le sol. La fraction limon fin du sol industriel présente un rapport C/N (35) très élevé, comparée à la fraction argileuse (C/N: 16) qui malgré sa grande surface spécifique contient moins de HAP mais un nombre similaire en bactéries dégradantes. L'azote semble jouer un rôle important à plus long terme, mais puisque la dégradation des HAP est très faible dans les fractions fines, d'autres facteurs (nutritionnelles et énergétiques par exemple) sont probablement limitant (C facilement dégradable, P organique, O₂ etc....).

Des expériences simulant les processus d'atténuation naturelle ont été également menées sur deux sols représentatifs de grands groupes types de sol (sols de Bordeaux et de

Riedhof). Dans un sol sableux (C : 0,7%) contaminé artificiellement avec un mélange de HAP et incubé en microcosme avec une humidité proche de la capacité au champ, les dénombrements des bactéries dégradant le phénanthrène ont montrés que ces bactéries étaient présentes dans le sol avant son exposition aux HAP à des densités similaires (10^2 /g de poids sec) dans les 4 classes d'agrégats. Après une période d'incubation du sol avec les HAP, une croissance significative de ces bactéries a été observée (10^6 - 10^7 /g de poids sec) avec un changement dans leur distribution au sein des agrégats. Ce sont les agrégats de la taille des sables (2000-50 μ m) et des argiles (< 2 μ m) qui contiennent les fortes densités en bactéries dégradantes alors que les HAP étaient beaucoup plus concentrés dans les agrégats fins, particulièrement les limons fins.

Des différences dans la distribution des HAP et des bactéries dégradantes ont été également observées entre les classes d'agrégats du sol riche en matière organique (sol de Riedhof, C: 22%) et qui a été exposé au même mélange de 8 molécules de HAP pendant une période d'incubation plus longue (2 ans). Les HAP récalcitrants (dibenz(a,h)anthracene, benzo(g,h,i)perylene) semblent être biodégradables dans les agrégats de petite taille (< 20 μ m) alors que, leur dissipation dans les agrégats les plus larges n'apparaît pas très affectée même après 2 ans de vieillissement de la contamination. Les molécules de HAP à faible poids moléculaire (phénanthrène, anthracène et fluoranthène). semblent être rapidement dégradées dans le sol total (non fractionné) dès la première année d'incubation. Le reste de ces molécules de HAP non biodégradées est fortement concentré dans les agrégats de petites tailles < 20 μ m et leur dissipation n'est affectée qu'après des durées plus longues (1 à 2 ans) d'incubation. L'abondance des bactéries dégradantes dans toutes les classes d'agrégat confirme que des facteurs autres que la présence de ces bactéries contrôlent la biodégradation. La bio-disponibilité des HAP pour la dégradation bactérienne semble dépendre de leur adsorption (ou fixation) à la surface des agrégats. L'adsorption préférentielle des HAP à certaines classes d'agrégats dépend de la quantité des argiles et sans doute encore plus des matières organiques présentes dans les sols.

Au vue de ces résultats, l'organisation des particules du sol, la nature et la structure des agrégats semblent être des paramètres importants de caractérisation des sols pollués

(localisation et séquestration des HAP) pour définir le comportement et les critères de dégradation des HAP. Des manipulations qui modifient l'agrégation des sols pollués peuvent potentiellement influencer et favoriser l'accessibilité des HAP aux microorganismes, comme le montre les résultats expérimentaux, et par conséquent leur dégradation dans le sol.

I. Introduction

Les problèmes de pollution des sols et des aquifères par les Hydrocarbures polyaromatiques polycycliques (HAP), rencontrés en particulier dans les sols de sites industriels tels que les anciennes sites de cokeries et usines à gaz, impliquent la connaissance du comportement de ces composés et le développement de méthodes de traitement. La biodégradation apparaît comme une méthode attractive pour la réhabilitation des sites pollués en raison de son intérêt économique et environnemental. La phytoremédiation associant l'action biophysico-chimique des racines, présente également l'avantage d'opération *in situ* en confinant les pollutions, en stabilisant le sol et en formant une niche écologique pour la microflore. Ces contaminants hydrophobes ont une solubilité dans l'eau très limitée et qui décroît très rapidement quand la masse molaire de ces composés augmente ce qui rend leur accessibilité pour les micro-organismes très faible. En vue d'améliorer les techniques de bioremédiation des sols pollués par les HAP, une meilleure connaissance des paramètres physico-chimiques et microbiologiques qui déterminent l'accessibilité, la mobilité, mais aussi la bio-disponibilité de ces HAP s'impose.

I.1. Biodégradation des HAP

Les microorganismes jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques dans les écosystèmes terrestres. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes. Les bactéries dégradant les HAP sont fréquentes dans les sols historiquement pollués (Trzesicka-Mlynarz et Ward, 1995). Ces bactéries se manifestent immédiatement après la pollution du sol car l'exposition aux HAP induit une sélection et/ou une adaptation des communautés bactériennes. En effet, de nombreuses bactéries sont capables de dégrader les HAP directement en les utilisant comme substrat (Stringfellow et Aitken, 1994 ; Bogan et Lamar, 1996). Ces bactéries ont été largement étudiées et de nombreuses souches ont été isolées. Mais ces cultures pures, qui dégradent très bien les HAP en conditions expérimentales, se révèlent parfois peu efficaces dans des sols pollués. Les communautés microbiennes peuvent aussi utiliser les HAP comme

source de C mais peuvent les dégrader partiellement ou totalement lorsqu'une autre source de C est disponible pour leur métabolisme.

Deux types de processus de biodégradation des HAP sont à distinguer : la minéralisation complète des HAP et la dégradation par co-oxydation ou co-métabolisme. L'étape initiale de ces deux processus est une réaction directe d'oxygénation par l'oxygène moléculaire faisant intervenir des oxygénases. De nombreuses espèces bactériennes sont connues pour leur capacité à utiliser comme unique source de carbone et d'énergie les composés xénobiotiques (Cerniglia, 1992). La disparition de ces molécules dans les écosystèmes peut être due aussi, dans certains cas, à un autre processus que l'on appelle co-métabolisme. Il est défini par une dégradation partielle (accumulation des métabolites) par un ou des microorganismes utilisant un ou d'autres substrats pour leur croissance. Il y a co-métabolisme lorsque la dégradation d'un composé organique n'apporte, ni énergie, ni éléments assimilables à une population microbienne. La dégradation par co-métabolisme est souvent appelée co-oxydation dans le cas des HAP du fait de la nature des réactions subies, la molécule de HAP co-oxydé étant appelée co-substrat (tableau 2).

Tableau 2 : Dégradation des HAP par co-métabolisme (Cerniglia, 1992)

Souche	Utilisation des HAP comme Co-substrats							
	HAP de croissance	NAP	FLU	PHE	ANT	FLT	PYR	B(a)PL
<i>Rhodococcus sp.</i>	PHE	+	+	S	S	S	S	+
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	FLT		+	+	S	S	+	-
<i>Rhodococcus sp.</i>	NAP	S	-	+	+	-	-	
<i>Rhodococcus sp.</i>	FLU	-	S	+	-	-	-	
<i>Pseudomonas cepacia</i>	a	S	S	S	S		-	-
<i>Mycobacterium sp.</i>	PHE		+	S		S	S	

+ : cométabolisme

- : pas de cométabolisme

S : HAP utilisé comme substrat

a : essais effectués avec des cellules lavées (sans source de carbone exogène)

Des études récentes (Bouchez et al., 1995 ; Tiehm et Fritzsche, 1995) ont mis en évidence l'importance du processus de co-métabolisme dans le cas où les substrats de croissance seraient les HAP eux mêmes (dégradation de mélange de HAP). Ainsi, une souche du genre *Mycobacterium*, ne peut pas croître en présence du fluorène comme unique source de carbone,

mais elle est capable de le co-métaboliser en présence d'un autre HAP, source de carbone et d'énergie (pyrène, phénanthrène ou fluoranthène). La dégradation du pyrène par cette souche est également accélérée par la présence du phénanthrène.

1.2. Facteurs influençant la biodégradation des HAP

La biodégradation des HAP et les processus d'atténuation naturelle dépendent de plusieurs facteurs physico-chimiques. Ces facteurs semblent contrôler les besoins énergétiques et nutritionnelles des communautés microbiennes et en même temps la disponibilité des polluants aux microorganismes du sol (Lion, 1990 ; Ball et Roberts, 1991 ; Pignatello et Xing, 1996).

Les bactéries inoculées aux sols sont souvent incapables de dégrader les polluants suite à une utilisation préférentielle d'autres composés organiques et surtout à une inaccessibilité physique de ces polluants (Devare et Alexander, 1995). La protection physique de ces polluants au sein des agrégats du sol rend les bio-traitements *in situ* souvent inefficace même après l'amélioration des conditions physico-chimiques tels l'addition d'oxygène, des nutriments, de l'eau pour stimuler l'activité microbienne (Manilal et Alexander, 1991 ; Morgan et Watkinson, 1992). La structure du sol contrôle à la fois la distribution des microorganismes et des matières organiques et xénobiotiques (Jocteur-Monrozier et al., 1991 ; Christensen, 1992 ; Kukkonen et Landrum, 1996) et par conséquent les processus de bio-disponibilité des polluants dans le sol. Ainsi, le succès de la bioremédiation va dépendre de la nature des HAP et de la nature du sol. Les propriétés du sol telles que la concentration en matière organique et son degré de maturation, la structure ou bien la taille des particules (texture) influencent le taux de dégradation.

Plusieurs recherches ont montrés que la bio-disponibilité des composés organiques peut être inversement proportionnel à leur temps de contact avec la matrice sol (Kelsey et al., 1997). En effet l'incubation du sol avec les polluants organiques à plus long terme entraîne souvent la formation de résidus stables inaccessibles aux microorganismes. Ceci

résulte de l'adsorption des polluants aux constituants du sol (essentiellement la matière organique et les argiles) ou de leur stabilisation au sein des agrégats du sol. L'effet du vieillissement de la contamination sur la biodégradation et l'extraction d'une molécule de HAP a été observé dans certaines études en terme de vitesse de minéralisation (Hatzinger et Alexander, 1995) ou d'extraction (Nam et al., 1998) de la molécule cible. La séquestration préférentielle des polluants entre les constituants du sol, notamment la MO est parmi les mécanismes les plus importants dans l'immobilisation des HAP dans le sol (Weissenfels et al., 1992; Kan et al., 1994).

D'autre part, la biodégradation dépend également de la présence de microorganismes indigènes susceptibles de métaboliser les HAP. Les facteurs environnementaux sont également à considérer lors d'un traitement de bioremédiation *in situ*. Pour cela certaines conditions du milieu comme la température, l'humidité relative, les conditions d'oxygénation (Song et Bartha, 1990) et la nutrition en éléments minéraux (Ward Liebeg et Cutright, 1999 ; Johnson et Scow, 1999) sont souvent optimisés lors des traitements *in situ* afin de stimuler la microflore endogène ou la microflore exogène inoculée. En effet, la présence et l'activité de ces microorganismes compétents sont contrôlés par les conditions de leur environnement mais aussi par la disponibilité du substrat (Horinouchi *et al.*, 2000). La différence dans l'activité de ces bactéries dépend également de leur distribution au sein des agrégats et de leur localisation dans les macro- et micropores du sol (Lee et Foster, 1991).

1.3. Rétenion des HAP aux constituants du sol

1.3.1. Effet du temps de contact polluant - sol

Regroupés sous le terme de vieillissement, les phénomènes liés au temps de contact du polluant avec le sol sont encore incomplètement caractérisés.

Le terme de vieillissement englobe les réactions éventuelles de polymérisation et la formation de liaisons covalentes avec des substances humiques du sol, mais il caractérise également la dépendance temporelle des phénomènes d'adsorption /désorption des polluants dans les sols et se traduit généralement par une limitation de l'accessibilité du polluant (ou une augmentation de sa rétention). Dans le cas des HAP, l'adsorption dépend principalement d'interactions de nature hydrophobe entre le polluant et la matrice solide dont la fraction

organique constituée essentiellement de substances humiques et de phases organiques d'origine anthropique peut jouer un rôle prédominant (Pignatello et Xing, 1996 ; Bayard, 1997). De nombreux travaux de recherche ont mis en évidence que l'adsorption apparente des HAP dans les sols n'était pas instantanée mais était un phénomène complexe nécessitant des jours et des mois avant qu'un équilibre ne soit atteint (Steinberg et al., 1987 ; Bayard et al., 1998 ; Mahjoub, 2000). L'adsorption des polluants organiques est cinétiquement limitée par des phénomènes de diffusion intra-particulaire dans les microagrégats du sol (Ball et Roberts, 1991 ; 1992) et dans la phase organique du sol (Pignatello et Xing, 1996). En effet, ces molécules se fixent instantanément à la surface des micro-particules, alors que leur adsorption sur les sites internes est cinétiquement limitée par la diffusion moléculaire intra-agrégat rendue difficile par l'organisation structurale des micropores des microagrégats du sol. La taille et la forme des micropores ainsi que les caractéristiques de surface interne des pores déterminent les cinétiques de transfert des polluants dans les sols (Wu et Gschwend, 1988).

Les caractéristiques à la fois du sol et de la molécule de HAP sont des paramètres à prendre en compte pour ces processus d'adsorption ou de rétention des HAP aux constituants du sol. Le sol, de part sa composition et sa structure, peut avoir une influence considérable sur la rétention des HAP (Pignatello et Xing, 1996 ; Guerrin et Boyds, 1997 ; Kyoungphile et Alexander, 1998 ; Mahjoub, 2000).

I.3.2. Effet des constituants minéraux du sol

- Les argiles : les principales caractéristiques des argiles résident dans leur propriétés colloïdales, leur capacité de rétention d'eau et leur grande surface spécifique qui leur confèrent de fortes capacités d'échange, donc d'adsorption. Les argiles entrent dans la composition de nombreux complexes argilo-humiques, favorisant la rétention des HAP à long terme.

- Les sables et limons : c'est la fraction minérale grossière, généralement constituée de quartz, de feldspaths et de micas. Bien que les sables et les limons grossiers ont un rôle fondamental dans l'édification de la structure du sol, ces deux fractions minérales ne semblent pas intervenir de façon importante dans les phénomènes d'adsorption des HAP dans les sols (Bayard, 1997 ; Jayr et al., 2000).

- Les carbonates : les interactions des HAP et les carbonates sont très peu connus. Les composés de type HAP semblent avoir peu d'interactions avec les carbonates (Martins, 1993).
- Les oxydes et les hydroxydes : ils proviennent principalement de l'altération des argiles, et sont connus pour leur capacité de rétention des molécules organiques ionisées (Martins, 1993). Les HAP, molécules neutres, ont peu d'interaction avec les oxydes ou les hydroxydes.
- Texture et structure du sol : les propriétés adsorbantes des sols dépendent de deux caractéristiques fondamentales : leur texture et leur structure. Ces caractéristiques déterminent la porosité et la perméabilité des sols, deux facteurs qui influencent l'adsorption et la mobilité des polluants organiques.

I.3.3. Effet de l'eau du sol

En milieu naturel, l'adsorption des polluants organiques dans les sols s'effectue principalement en condition insaturée. La teneur en eau du sol est un facteur déterminant pour la répartition du polluant dans les trois phases du sol. Si le polluant est présent en phase gazeuse, la présence de l'eau à la surface du sol peut réduire l'adsorption du polluant s'il est hydrophobe (par répulsion), ou accroître sa rétention s'il est hydrophile (liaison hydrogènes avec les molécules d'eau ou dissolution dans l'eau immobile). L'eau pourra entrer en compétition avec les molécules organiques pour l'adsorption sur les matériaux solides du sol entraînant ainsi une baisse de l'adsorption des polluants lorsque le taux d'humidité du sol augmente (Chiou et Shoup, 1985).

I.3.4. Effet du pH du sol

Le pH de la solution du sol est un des principaux paramètres gouvernant le partage des molécules organiques entre les phases solides et la phase aqueuse. Dans le cas des HAP, l'effet du pH est principalement indirect soit au niveau du sol, par modification de sa structure et de ses propriétés, soit en agissant sur la composition de la solution aqueuse, notamment en présence de matière organique dissoute (augmentation de la surface spécifique des acides humiques entraînant une augmentation de la solubilité du composé organique) (Mc Carthy et Jimenez, 1985).

I.3.5. Effet des constituants organiques du sol

La matière organique du sol se décompose en deux fractions distinctes :

-la fraction organique vivante composée de la microflore du sol, de sa faune et des racines des plantes.

-la fraction organique morte constituée de débris organiques d'origines animale ou végétale, plus ou moins décomposée en humus sous l'action des micro-organismes du sol.

Les matières humiques proviennent de la décomposition et de la réorganisation des matières organiques contenues dans les sols.

La présence des matières organiques dissoutes telles que les substances humiques et fulviques modifie de façon significative le comportement des molécules organiques dans les milieux aqueux et dans le sol (Barriuso et al., 1992). Elle augmente la solubilité en phase aqueuse des polluants organiques et diminue leur adsorption sur les phases solides (McCarthy et Jimenez, 1985). Le degré d'influence de la matière organique sur les polluants dépend bien évidemment de la nature et des caractéristiques chimiques de ces derniers.

Objectif de l'étude

L'étude du devenir des HAP dans différents types de sols par la mesure de leur distribution au sein des agrégats du sol doit contribuer à la compréhension de la complexité des processus d'atténuation naturelle et de la bioremédiation des sols.

L'objectif principal de cette étude est de déterminer (i) si la distribution des polluants est uniforme entre les différentes classes d'agrégats du sol (ii) si les communautés microbiennes sont distribuées de façon homogène dans les différentes fractions d'agrégats ou bien sont-elles concentrées dans certaines fractions où les HAP sont préférentiellement présents et (iii) si la distribution des polluants et des populations microbiennes change avec le temps.

Ceci a été étudié d'une part à travers des analyses comparatives entre un sol industriel pollué et un sol artificiellement contaminé présentant des caractéristiques physico-chimiques très proches. D'autre part, l'analyse des paramètres microbiens et la dissipation des HAP ont été déterminées dans deux types de sols artificiellement contaminés ; un sol faiblement structuré (sol sableux) et un sol riche en matière organique (tourbe).

II. Matériel et Méthodes

II.1. Les sols

Un sol historiquement pollué (SP), fourni par Rhône-Poulenc provenant de sites pollués par des hydrocarbures polyaromatiques et trois sols de référence ont été retenus pour cette étude. Les sols de référence ont été considérés soit pour leur analogie avec le sol industriel pollué soit pour leur représentativité des grands types de sols possédant des propriétés bien distinctes (texture, pH, matières organiques...). Les échantillons de sols sont prélevés dans la couche superficielle (horizon A), séchés et tamisés à 2 mm; il s'agit :

- BD : un sol très sableux acide (spodosol), dit sol de Bordeaux (région des Landes, France)
- BF : un sol calcimagnésique (rendzine) légèrement alcalin, à teneur élevée en matières organiques, dit de Bellefontaine (Plateau de Haye, Meurthe-et-Moselle, France)
- RD : un sol organo-argileux (tourbe), dit de Riedhof (tourbe de la plaine d'Alsace, France)

Les caractéristiques physico-chimiques de ces sols sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques des sols après dispersion du sol avec des résines Na

Sols	SG (%)	SF (%)	LG (%)	LF (%)	A (%)	C (%)	N (%)	CaCO ₃ (%)	pH _{H2O}
BD	88,8	8,2	1,0	1,3	0,7	0,7	0,03	0	4,5
BF	22,9	6,6	7,2	28,6	27,4	10,1	0,9	30	7,9
RD	2,8	7,4	4,0	30,4	50,2	22,4	1,7	2,2	7,3

SG : Sables Grossiers
 LG : Limons Grossiers
 A : Argile

SF : Sables Fins
 LF : Limons Fins
 C : Carbone

N : Azote

II.1.1. Caractéristiques du sol industriel

Pour le sol industriel, l'analyse granulométrique (dispersion du sol avec des résines Na) fait apparaître le caractère sableux de l'échantillon de sol. Cependant, la dissolution des carbonates et la destruction des matières organiques qui forment des « ciments », montrent qu'une grande partie de ces sables est constituée par des carbonates (Tableau 4).

Tableau 4 : Analyses granulométriques du sol industriel SP.

% SG	% SF	% LG	% LF	% A
Echantillon sec sans destruction de la MO et CaCO ₃				
58,2	22,5	5,8	5,7	7,2
Echantillon sec avec destruction de la MO et CaCO ₃				
11,8	15,5	5,7	4,4	5,3
Echantillon dispersé à l'eau				
63,0	16,0	5,6	5,7	8,1

II.1.2. Mise en solution des HAP dans l'eau « désorption »

Des cinétiques de désorption ou de mise en solution des HAP dans l'eau ont été effectuées sur le sol industriel pollué non fractionné et ses fractions d'agrégats de la taille des sables (2000-200 µm) et des limons (20-2 µm). 25 g de chaque échantillon sont mis en contact avec 200 ml d'eau, puis sont agités par retournement sur des durées allant de 1 heure à 238 heures. Les solutions aqueuses d'extraction sont récupérées après centrifugation, et les HAP sont extraits par extraction solide/liquide sur des cartouches garnies de phase hydrophobe C18 Supelco.

Des essais d'extraction effectués sur les eaux de désorption ont montré que l'extraction liquide-liquide avec du dichlorométhane ou du chloroforme était totalement inopérante sur ces solutions alors que par extraction solide/liquide sur phase hydrophobe C18, des quantités significatives sont extraites.

II.2. Les polluants

Les HAP retenus pour les travaux expérimentaux sont ceux de la liste de référence des produits recherchés dans les sols pollués, de laquelle on a éliminé le naphthalène en raison de sa volatilité et le benzo-a-pyrène, en raison de sa toxicité.

Les 8 HAP étudiés, PHE : phénanthrène, ANT : anthracène (Prolabo), FLT : fluoranthène, B(a)ANT : benz(a)anthracène, CHY : chrysène, B(k)FLT : benzo(k)fluoranthène, dB(a,h)ANT : dibenz(a,h)anthracène, B(g,h,i)PL : benzo(g,h,i)pérylène (Acros) ont été utilisés sous forme pure à 99%.

II.3. Contamination et incubation des sols

II.3.1. Contamination des sols

Les 3 sols de référence (BD, RD et BF) ont été expérimentalement pollués par un mélange de 8 molécules de HAP en solution dans l'hexane. La contamination a été effectuée sur des sols séchés, tamisés à 2 mm, à raison de 1 g de HAP totaux par kg de sol sec. La concentration des 8 HAP dans le sol est la suivante : Phénanthrène (200 mg), Anthracène (200 mg), Fluoranthène (200 mg), Benz(a)anthracène (50 mg), Chrysène (200 mg), Benzo(k)fluoranthène (50 mg), Dibenz(a,h)anthracène (50 mg) et Benzo(g,h,i)perylène (50 mg). La contamination a été effectuée en solubilisant 2 g du mélange des 8 HAP dans 200 ml d'hexane qui ont été mélangés avec 100 g de sol; après évaporation du solvant, le sol contaminé a été mélangé avec 1,9 kg de sol non contaminé.

II.3.2. Incubation des sols

Les sols contaminés artificiellement (BD, RD et BF) ainsi que le sol industriel pollué (SP) ont été incubés dans des dispositifs en cuves de 15 cm de hauteur et 30 cm de diamètre utilisées comme des systèmes d'incubation en microcosme. Les sols ont été mis sous abri de la lumière avec des températures variables entre 5 et 25°C durant l'année. L'humidité du sol est proche de la capacité au champ, elle est contrôlée et maintenue durant l'incubation par des mesures périodiques du poids du sol. Les mesures ont porté sur le sol initial et sur les prélèvements effectués au cours du vieillissement de la contamination.

II.4. Extraction et analyse des HAP dans les sols

II.4.1. Extraction des HAP

L'extraction des HAP d'un sol, d'après la norme ISO 13877, est réalisée avec du chloroforme dans un appareil de Soxhlet. Des extractions ont été faites avec divers solvants (chloroforme, méthanol, hexane), avec et sans broyage des sols. Après différents essais d'extraction, la méthode retenue consistait à extraire les HAP du sol après broyage avec 200 ml de chloroforme par le soxhlet sur une durée de 4 heures. Les extraits sont filtrés sur filtre plissé en cellulose et dilués, en fonction des concentrations en HAP des échantillons.

Pour les sols artificiellement contaminés, plusieurs extractions (2 à 3) ont été effectuées juste après leur contamination pour vérifier l'homogénéité de la contamination.

II.4.2. Analyse des HAP

Le dosage des HAP a été effectué par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse GC-MS Varian Saturn III selon les conditions opératoires suivantes : Des prises d'essais d'échantillons de 1 µl solubilisées dans du dichlorométhane sont injectées dans un injecteur programmable en température (SPI) de 25°C à 300°C à raison de 180°C par minute, la séparation étant effectuée en programmation de température avec une colonne capillaire DB5ms J&W Scientific (30 m x 0,25 mm id, 0,25 µm) programmé de 70°C à 150°C à raison de 10°C minute et de 150 à 300°C à raison de 6°C minute suivi d'un palier isotherme de 10 minutes à 300°C. La température de la ligne de transfert est de 250°C.

Tableau 5 : Ions moléculaires des HAP analysés au cours de l'étude

HAP	Ions moléculaires
PHE	178
ANT	178
FLT	202
B(a)ANT	228
CHY	228
B(k)FLT	252
dB(a,h)ANT	278
B(g,h,i) PL	276

Les conditions opératoires du spectromètre de masse (Ion-trap) sont les suivantes : température de « trape ionique » 220°C , mode de fonctionnement impact électronique à 70 eV acquisition des masses de 40 à 650 m/z à la vitesse de 3 microscans/seconde. La quantification des HAP a été faite en mode SIM (Single ion Monitoring) sur les ions moléculaires des composés (tableau 5).

II.5. Localisation des HAP dans le sol

L'extraction et le dosage des polluants fraîchement apportés ou au cours du vieillissement de la pollution non dégradée ont été effectués sur le sol total et sur des fractions d'agrégats de différentes tailles.

II.5.1. Fractionnement d'agrégat à l'eau

Les fractions granulométriques du sol ont été obtenues après dispersion à l'eau. 10 g de sol sec ont été agités avec 200 ml d'eau distillée pendant 1h sur un agitateur rotatif (40 tours /min), puis tamisés pour obtenir la fraction d'agrégat de 2000-50 μm correspondant à la taille des sables (S). La fraction inférieure à 50 μm est re-dispersée dans 100 ml d'eau distillée puis agitée pendant 16h pour récupérer les fractions d'agrégats de 50-20 μm , 20-2 μm et < 2 μm correspondant respectivement, à la taille des limons grossiers (LG), limons fins (LF) et argiles (A).

La teneur en carbone du sol et de ses fractions a été analysée par dosage élémentaire (Analyseur CHN Carrlo Erba) après décarbonation des échantillons à l'acide acétique.

II.6. Analyses microbiologiques

Les dénombrements microbiens sont effectués à partir du sol (< 2 mm) avant fractionnement et des différentes fractions granulométriques constitutives de ce dernier (sables : S, limons grossiers : LG, limons fins : LF et argiles : A). Les échantillons de sol et d'agrégats sont mis en suspension à 10% (w/v) dans de l'eau stérilisé en présence de billes de verre, et agités pendant 1h au moyen d'un agitateur rotatif. Des dilutions successives (au 1/10 dans NaCl à 0,85%) sont réalisées à partir de cette suspension, et sont utilisées pour dénombrer les communautés bactériennes.

II.6.1. Dénombrement de la microflore bactérienne "totale"

Les dénombrements ont été, dans un premier temps, réalisés sur milieu nutritif dilué (1g/l) avec gélose, pour favoriser la culture de microorganismes oligotrophes. Dans un second temps, la microflore totale a été dénombrée en plaques de microtitration

- *Dénombrement sur milieu gélosé*

Ils sont effectués en boîtes de Petri sur un milieu gélosé NA (Nutrient Agar, Difco) dont la composition est la suivante :

Milieu NB (Nutrient Broth, Difco)	:	1g
Agar	:	15g
Eau distillée	:	1 litre qsp

Chaque suspension-dilution du sol et de ces fractions (10 ml) est inoculée à la surface des milieux à raison de 3 dépôts ou spots de 10 μ l. Le nombre de colonies pour chacun des spots (3 par échantillon) est déterminé après 4 jours d'incubation à 28°C.

- *Dénombrement en plaque de microtitration*

Les dénombrements des microorganismes par microtitration sont réalisés en utilisant des microplaques stériles (Microtest III, Falcon-3072 ; Polylabo A 6013) de 96 cupules, a fond plat et d'une capacité de 0,3 mL. Le milieu de culture NB, constitué de 1g.L⁻¹ de Nutrient Broth (Difco), est apporté à raison de 0,2 mL par cupule. Chaque cupule (40 par dilution) est inoculée par 25 μ L de suspension-dilution et les microplaques sont incubées durant 1 semaine à 28°C. Les lectures sont effectuées tous les jours à une DO de 620 nm à l'aide d'un lecteur OSI. Les nombres les plus probables (NPP) de bactéries hétérotrophes totales des échantillons sont calculés au moyen d'un programme informatique de calcul de probabilités (Hughes et Plantat, 1982).

II.6.2. Dénombrement de la microflore bactérienne dégradant les HAP

La microflore dégradante a été dénombrée en plaques de microtitration, dans un milieu de culture minéral, en présence d'un mélange d'HAP, selon la méthode NPP développée par Wrenn et Venosa (1996).

Principe de la méthode

La technique NPP a été particulièrement étudiée pour les microorganismes qui croissent en présence de substrats insolubles, puisqu'un milieu solide présentant une distribution homogène des sources de carbone est alors difficile à préparer. De même, plusieurs géloses (agar) entrant dans la préparation de milieux solides contiennent des impuretés qui permettent la croissance des microorganismes qui, de ce fait, ne dégradent pas le substrat testé, ce qui conduit à une surestimation du nombre des populations bactériennes étudiées.

La méthode NPP en microplaque a été développée pour la microflore dégradante selon le

mode opératoire suivant : les suspensions-dilutions du sol sont inoculées (25 μL / cupule) dans un milieu de culture minéral additionné d'une source de carbone constituée d'un mélange de 3 HAP. La composition du milieu minéral est la suivante :

Milieu de Bushnell-Hass (Difco) :	3,27 g
NaCl :	8,5 g
Eau distillée :	1 litre qsp

Après homogénéisation, le pH du milieu minéral est ajusté à 7,4.

Les HAP sont préalablement solubilisés dans de l'hexane et introduits dans les microplaques à raison de 10 μL par cupule. Après évaporation de l'hexane, le milieu minérale est réparti dans les microplaques à raison de 0,2 mL par cupule suivant différentes modalités (1 ou 3 HAP). Le mélange final d'HAP par cupule, choisi d'après les résultats des expériences complémentaires est constitué de :

Phénanthrène	:	500 ppm
Anthracène	:	50 ppm
Fluorène	:	50 ppm

La croissance bactérienne et la dégradation d'au moins une partie des HAP est mise en évidence par le développement d'une coloration variant du jaune-orange au brun, indiquant la production de métabolites d'oxydation partielle des HAP, et en particulier de l'oxydation du phénanthrène et du fluorène présent dans le mélange d'HAP (Wrenn et Venosa, 1996).

Des dénombrements ont également été effectués à partir de milieu ne contenant que du phénanthrène afin d'étudier l'effet du mélange d'HAP sur la croissance bactérienne.

Après inoculation, les microplaques sont incubées 3 semaines à 28°C et à l'obscurité. Les cupules présentant des produits d'oxydation de couleur jaune-orangée sont comptabilisées toutes le semaines par mesure de la $\text{DO}_{405 \text{ nm}-620 \text{ nm}}$. Des témoins sans HAP ou sans inoculum bactérien sont également réalisés.

II.6.3. Expression des résultats

Le nombre des bactéries par gramme de sol sec, ou le nombre le plus probable de bactéries (NPP), est transformé en unité $\log_{10} \text{ g}^{-1}$. La transformation logarithmique est effectuée sur les valeurs moyennes des dénombrements et l'intervalle de confiance de la moyenne est donné au seuil de 5%.

III. Résultats

III.1. Propriétés physico-chimiques du sol industriel

III.1.1. Teneur en Carbone et en azote

La répartition du carbone et de l'azote dans les différentes fractions granulométriques du sol industriel nommé SP fait apparaître une concentration plus importante en azote dans les fractions fines de la taille des limons fins (20-2 μm) et des argiles (< 2 μm), alors que le carbone se concentre plus particulièrement dans les limons fins. Le rapport C/N dans les fractions d'agrégats du sol industriel, utilisé souvent comme indicateur de l'activité biologique des sols, est parfaitement corrélé à la taille des fractions et varie d'une valeur C/N :70 pour les agrégats de la taille des sables à une valeur de C/N :16 pour la fraction argile (tableau 6). Ce type de distribution montrant une augmentation du rapport C/N avec la taille granulométrique est couramment observé dans les sols « naturels ».

Tableau 6 : Caractéristiques des fractions d'agrégats obtenues après dispersion à l'eau du sol industriel (SP) incubé en microcosme.

Fractions d'agrégats	Masse de la fraction (%)	C/N
Sables (2000-50 μm)	81,4	70
Limons grossiers (50-20 μm)	8,0	48
Limons fins (20-2 μm)	7,6	35
Argiles (< 2 μm)	3,0	16

III.1.2. Caractérisation de la rétention des HAP par le sol industriel

Il semble opportun de vérifier si la « désorption » et/ou plutôt l'extraction des HAP est un paramètre essentiel de leur biodégradation. De plus, comme le statut des HAP dans le sol dépend du vieillissement de ces polluants, ce paramètre sera aussi considéré.

Ainsi, des expériences de mise en solution des HAP ont été effectués sur le sol industriel pollué (SP) mais, le suivi de l'évolution de l'extractabilité des HAP en fonction du vieillissement de la contamination a été mené dans un sol artificiellement contaminé (sol de

Bellefontaine : BF) aux caractéristiques physico-chimiques proches du sol industriel. Ceci contribuera à établir le comportement de ces HAP au cours du temps dans un sol.

III.1.2.1. Sol avant fractionnement

L'étude de la cinétique de mise en solution dans l'eau (désorption) des HAP conduite sur une durée de 238 heures montre que les composés organiques sont dissous ainsi que des composés polycycliques aromatiques. Les quantités de C organique désorbées du sol total sont plus importantes que celles des HAP (figure 2) mais ne représente que 0,7 à 0,8 % du carbone organique total.

La courbe représentant la mise en solution du carbone organique à partir du sol total a une allure tout à fait différente de celle des HAP. Elle montre que sur un pas de temps d'environ 90 heures on n'atteint pas de palier alors que celles concernant les HAP commencent à se stabiliser pour atteindre 5 µg/g de sol (somme des HAP) dans le sol non fractionné (figure 3).

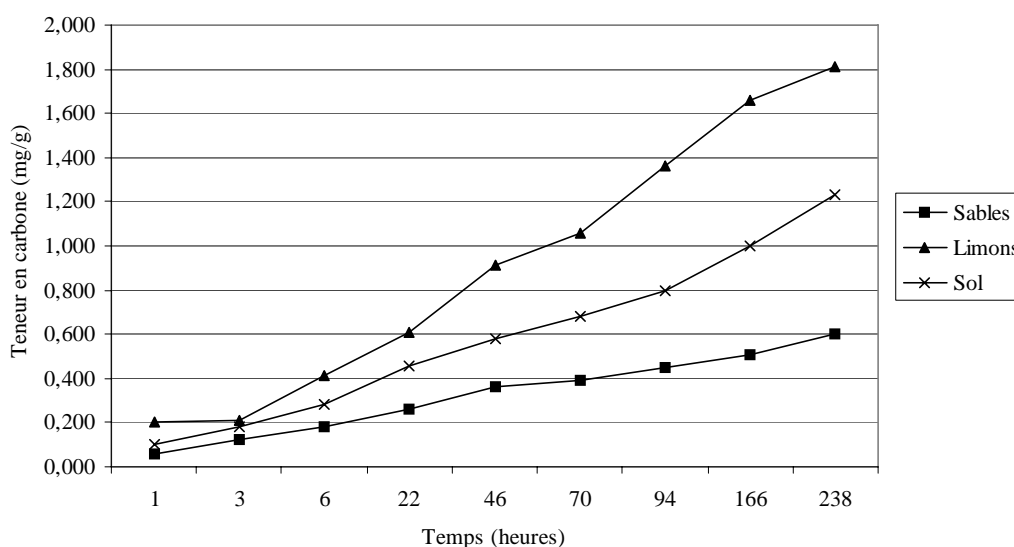


Figure 2 : Cinétique de désorption du carbone par l'eau sur le sol non fractionné et sur les agrégats de la taille des sables et des limons du sol industriel pollué.

Une analyse du comportement des différentes molécules de HAP au cours de la mise en solution montre que les molécules se classent dans l'ordre décroissant suivant : phénanthrène > fluoranthène > anthracène (figure 3). Des quantités plus faibles de chrysène, benzo(k)fluoranthène sont aussi désorbées. Cette distribution des HAP est aussi parfaitement corrélée au nombre de cycles des molécules. La nette prédominance des molécules d'HAP à

trois cycles et surtout le phénanthrène peut être expliquée par le fait que c'est la molécule la plus soluble dans l'eau.

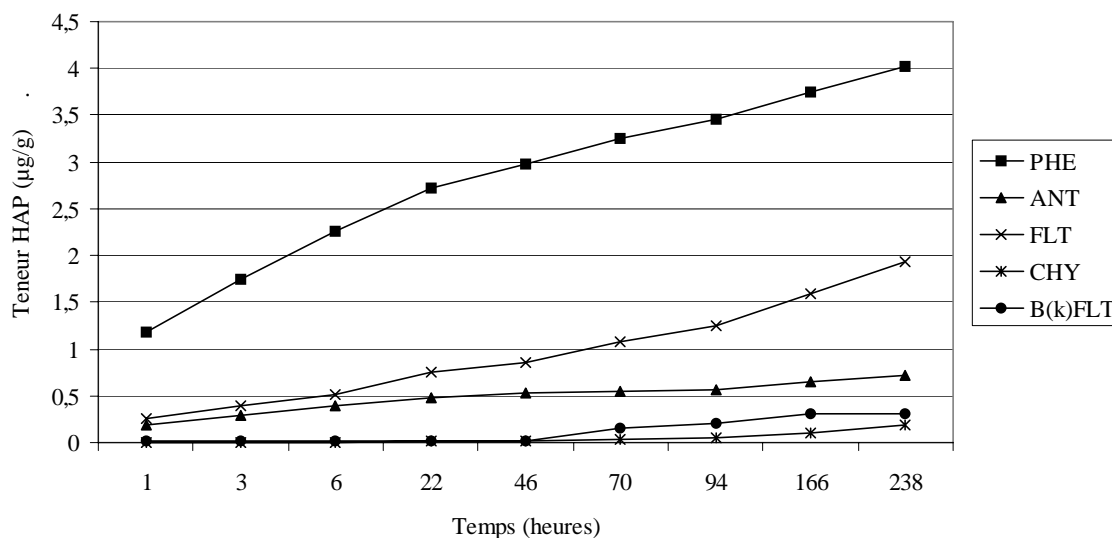


Figure 3 : Comparaison des cinétiques de mise en solution dans l'eau des 8 molécules de HAP dans le sol industriel pollué avant fractionnement.

III.1.2.2. Fractions granulométriques du sol

Les cinétiques de mise en solution des HAP dans l'eau sont plus rapides et la désorption totale est plus importante pour les agrégats de la taille des limons que pour ceux de la taille des sables (figures 4 et 5). Ce sont toujours les molécules à 3 et 4 cycles (PHE, FLT et ANT) qui sont les plus désorbées. En effet, les taux d'extraction (en %) observés dans les agrégats de la taille des sables sont respectivement, de 3,5 ; 1,6 ; 0,5 ; 0,1% et moins respectivement, pour le PHE, l'ANT, le FLT, le B(k)FLT et le CHY (figure 4). En revanche dans la fraction des limons, les taux d'extraction sont respectivement, de 5,3 ; 3,2 et 1,5% pour le PHE, l'ANT et le FLT, et aussi plus faibles pour le CHY (0,03%) (figure 5). Ces différences peuvent être dues également à la forte teneur des HAP dans les agrégats de la taille des limons.

La dissolution du carbone est plus rapide dans la fraction des limons (figure 2) par rapport à celle obtenue dans le sol total (non fractionné) et celle observée dans la fraction des sables qui relâche peu de carbone. Elle correspond à environ 1 % du carbone total pour les limons et à 0,5 % du C total pour le sables.

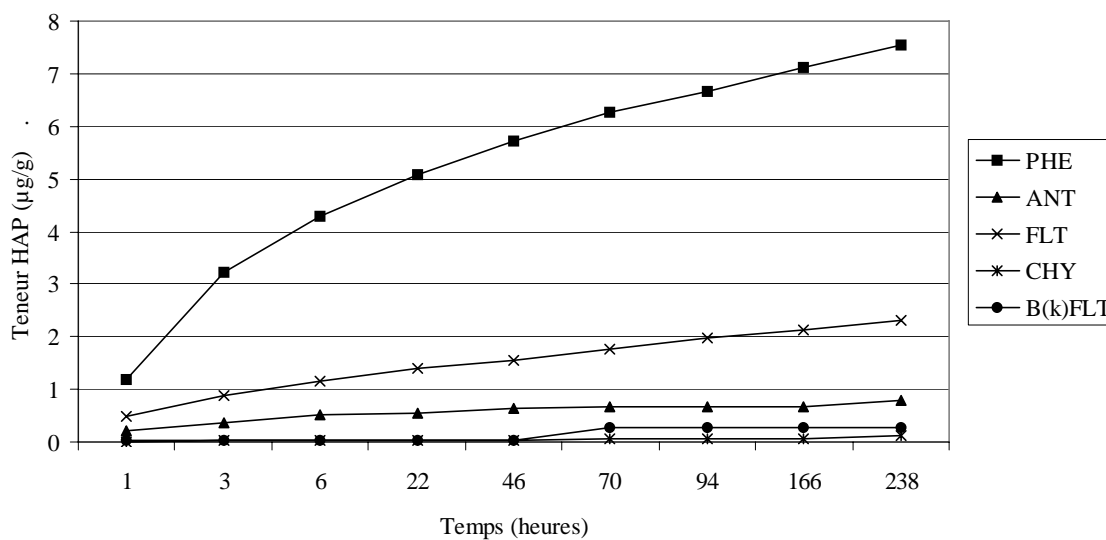


Figure 4 : Désorption des HAP dans la fraction d'agrégat de la taille des sables du sol industriel.

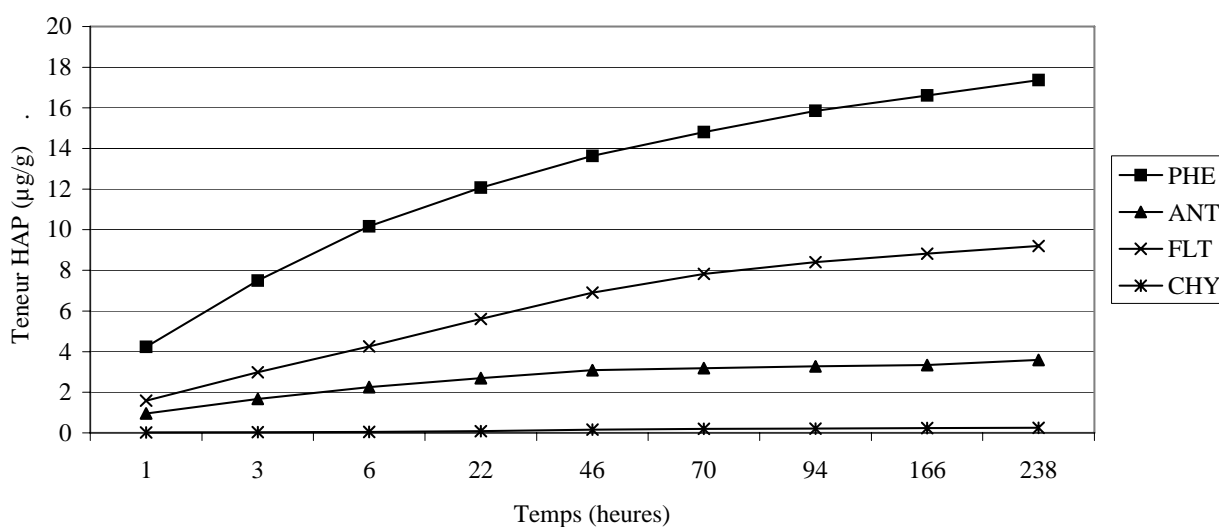


Figure 5 : Désorption des HAP dans la fraction d'agrégat de la taille des limons du sol industriel.

III.2. Devenir des HAP dans les sols

Des essais de biodégradation des HAP simulant les processus d'atténuation naturelle ont été menés dans des dispositifs en cuve (microcosme) où les sols sont incubés sous des

conditions naturelles à l'exception de l'humidité du sol qui a été maintenue à la capacité au champ (cf.§ II.3.).

III.2.1. Etude comparative entre un sol industriel et un sol artificiellement contaminé

Une analyse du devenir et de la répartition des HAP dans des sols contaminés artificiellement, au cours du vieillissement de la contamination, a été effectuée dans un premier temps dans le sol de Bellefontaine (BF) dont les caractéristiques physico-chimiques sont proches sol industriel (SP) (tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques physico-chimiques (dispersion du sol avec résines Na) du sol industriel (SP) et du sol contaminé artificiellement-Bellefontaine (BF).

Granulométrie (%)	Sols	
	SP	BF
sables	80,7	29,5
limons	11,5	35,8
argiles	7,2	27,4
C total	13,0	10,1
N total	0,34	0,90
CaCO ₃	26,3	30,0
pH _(H₂O)	7,9	7,9

1) Localisation des HAP dans les fractions d'agrégats des sols

Après 6 et 12 mois d'incubation en microcosme du sol de Bellefontaine (BF) contaminé avec un mélange de 8 molécules de HAP, des extractions et des analyses chimiques ont été effectuées à la fois sur le sol total (sol non fractionné) et sur ses fractions granulométriques de 4 classes d'agrégats (S, LG, LF et A) obtenues grâce à une technique de fractionnement non perturbant (cf.§ II.5.1). Les mêmes analyses ont été faites sur le sol industriel pollué (SP).

1-a) Sol artificiellement contaminé

La teneur des HAP totaux extractibles dans le sol avant fractionnement semble augmenter au cours de l'incubation du sol contaminé (BF). En considérant séparément chaque HAP introduit, les résultats de ces extractions montrent que les molécules à 3 cycles (PHE, ANT) sont extraites en très faibles quantités et seraient donc dégradées rapidement (tableau 8).

Tableau 8 : concentration des HAP, exprimée en pourcentage (%) de la quantité initialement ajoutée au sol, en fonction de la durée d'incubation du sol Bellefontaine. L'erreur standard est environ de 10%.

HAP	Teneur en % de la quantité initiale		Teneur ajoutée au sol (mg/Kg)	Teneur restante (12 mois) (mg/Kg)
	(6 mois)	(12 mois)		
PHE	0,24	0,46	200	1
ANT	0,39	0,61	200	1
FLT	1,42	1,75	200	3
B(a)ANT	12,2	14,1	50	7
CHY	70,3	92,7	200	18.5
B(k)FLT	36,5	43,9	50	22
dB(a,h)ANT	60,8	100	50	50
B(g,h,i)PL	84,6	100	50	50

Des données supplémentaires sur la localisation et la biodégradation de ces HAP au sein des 4 classes d'agrégats montrent aussi des différences de comportement de ces huit molécules de HAP. De même, la répartition des HAP totaux dans le sol BF contaminé montre des variations importantes entre les temps 6 et 12 mois d'incubation du sol (figure 6). En effet, les teneurs dans la fraction argileuse varient de 334 à 1805 $\mu\text{g/g}$ de poids sec d'échantillon, dans la fraction limons grossiers de 183 à 74 $\mu\text{g/g}$, dans la fraction limons fins de 1772 à 1215 $\mu\text{g/g}$ et dans la fraction sableuse de 29 à 36 $\mu\text{g/g}$. On soulignera l'augmentation importante de concentration dans la fraction argileuse entre 6 et 12 mois, mais cette fraction représente pondéralement peu de masse du sol (figure 6).

En effet, ces valeurs rapportées au poids chacune des fractions d'agrégats constituant ce sol (teneur x masse montrent les variations suivantes entre les temps 6 et 12 mois d'incubation : les quantités de HAP contenus dans chaque fraction, pour 100g de sol passent respectivement,

pour 6 et 12 mois de, 234 à 2870 μg dans la fraction argileuse de 349 à 432 μg dans la fraction limons grossiers, de 6382 à 14143 μg dans la fraction limons fins et de 2732 à 2986 μg dans la fraction sableuse (figure 6).

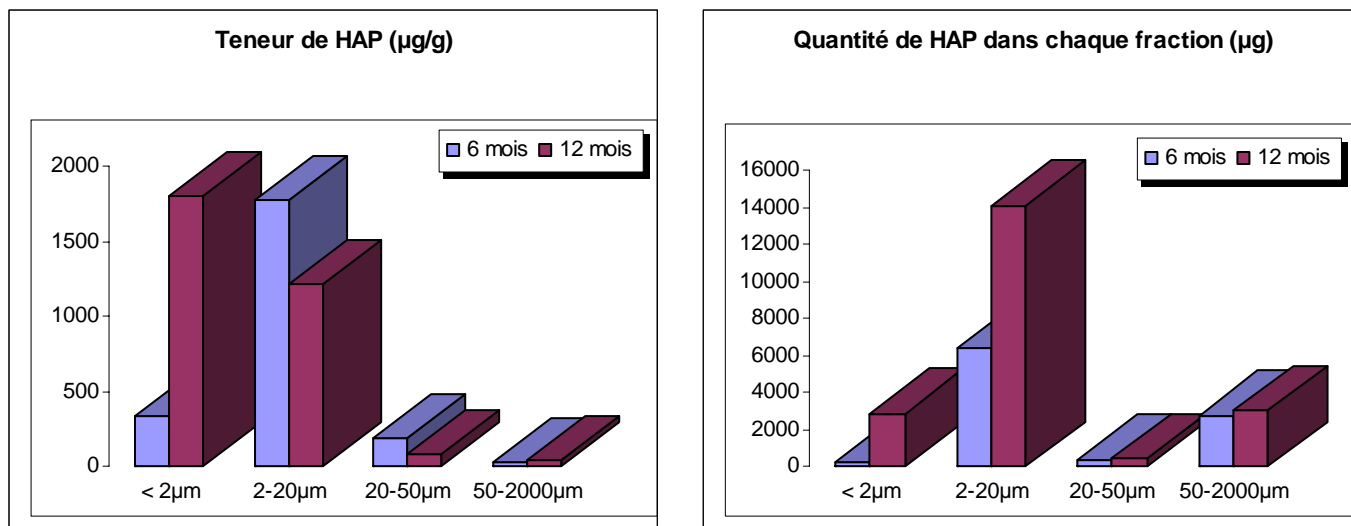


Figure 6 : Teneur et HAP (somme des 8 molécules) dans les 4 classes d'agrégats et leur distribution en masse de chaque fraction du sol de Bellefontaine contaminé après 6 et 12 mois d'incubation en microcosme.

En ce qui concerne la répartition individuelle des molécules de HAP au sein des différentes fractions d'agrégats entre 6 et 12 mois d'incubation, on observe (figures) :

- dans la fraction < 2 μm « argile », la concentration du PHE , B(a)ANT, B(g,h,i)PL, diminue entre six et douze mois, alors que celle de ANT , FLT , CHY, B(k)FLT, dB(a,h)ANT augmente de façon significative. Il apparaît que la distribution des molécules selon leur taille (3, 4, 5 et 6 cycles) de HAP n'est pas homogène dans cette fraction.
- dans la fraction 2-20 μm , « limons fins », les fortes teneurs de la plupart des molécules de HAP détectées dans cette fraction à 6 mois d'incubation diminuent significativement après 12 mois, plus particulièrement la molécule de CHY qui présentait un enrichissement relatif surprenant par rapport à la concentration de départ.
- dans la fraction 20-50 μm « limons grossiers », la concentration de chaque molécule de HAP diminue significativement, exception faite pour le dB(a,h)ANT qui augmente .
- dans la fraction 2000-50 μm « sable », une diminution des teneurs en PHE, ANT, FLT et CHY et une importante augmentation du B(a)ANT sont observés.

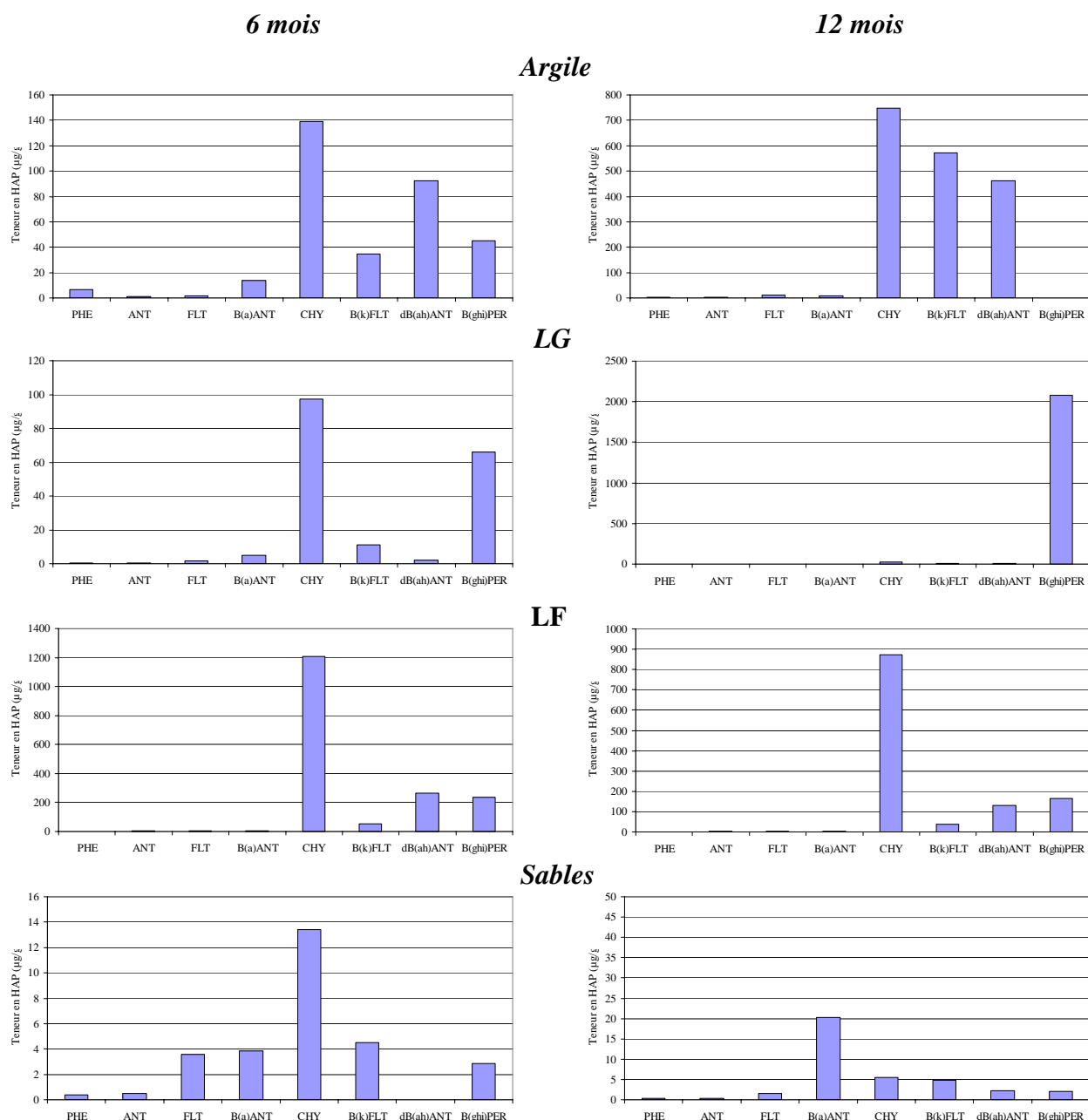


Figure 7 : Teneur des 8 molécules de HAP dans 4 classes d'agrégats obtenues après 6 et 12 mois de contamination du sol de Bellefontaine incubé en microcosme

1-b) Sol industriel

Des incubations du sol industriel pollué (SP) ont été menées d'une part, en microcosme comme pour le sol contaminé (BF) et d'autre part, dans des dispositifs agités à une température de 28°C (incubation en batch) où les échantillons de sol sont mis en suspension dans l'eau (25 g de sol dans 250 ml d'eau).

L'analyse du sol total (sans fractionnement) après 4 mois d'incubation montre que la concentration des HAP totaux n'est pas modifiée et ceci quelque soit le mode d'incubation du sol (figure 8). Néanmoins, la teneur des molécules de HAP à 3 et 4 cycles aromatiques (PHE, ANT, FLT) diminue significativement dans le sol SP après 4 mois d'incubation en batch.

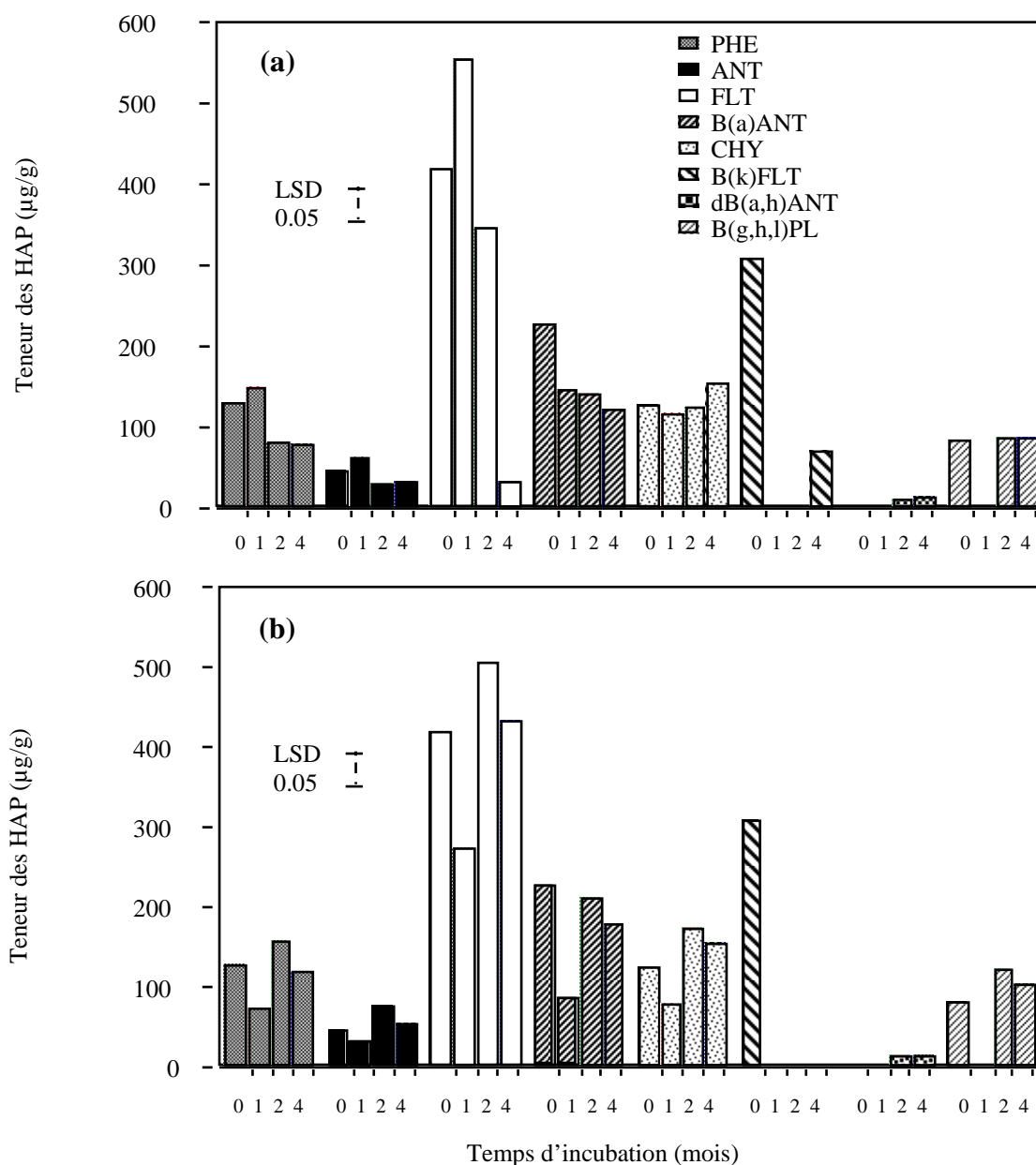


Figure 8 : Evolution de la teneur des HAP dans le sol industriel (SP) en fonction du mode d'incubation (a) batch, (b) microcosme .

La répartition des HAP dans le sol industriel (SP) incubé en microcosme montre, comme dans le cas du sol contaminé (BF), que les rendements des extractions sont meilleurs sur les fractions d'agrégats que sur le sol total (figure 9). La répartition des 8 molécules d'HAP dans ces classes d'agrégats montre des concentrations importantes des HAP dans les limons, plus

particulièrement la fraction 2-20 μm avec des teneurs élevées en molécules de HAP de 4 et 5 cycles (FLT, B(a)ANT , CHY, B(a)FLT). Les fractions d'agrégats les plus fines représentent une faible proportion dans le sol SP, seulement 7,6% pour les limons fins et 3% pour les argiles de la masse totale du sol (tableau 6). Mais la fraction LF présente un rapport C/N (35) plus élevé que celui de la fraction A (C/N : 16). Les teneurs et la nature des HAP sont peu différentes pour les fractions $> 50 \mu\text{m}$ et $< 2 \mu\text{m}$. Cependant, en raison de leur pourcentage pondéral important, les sables ($> 50 \mu\text{m}$) renferment les plus grandes quantités d'HAP , même si leur teneur en HAP est plus faible.

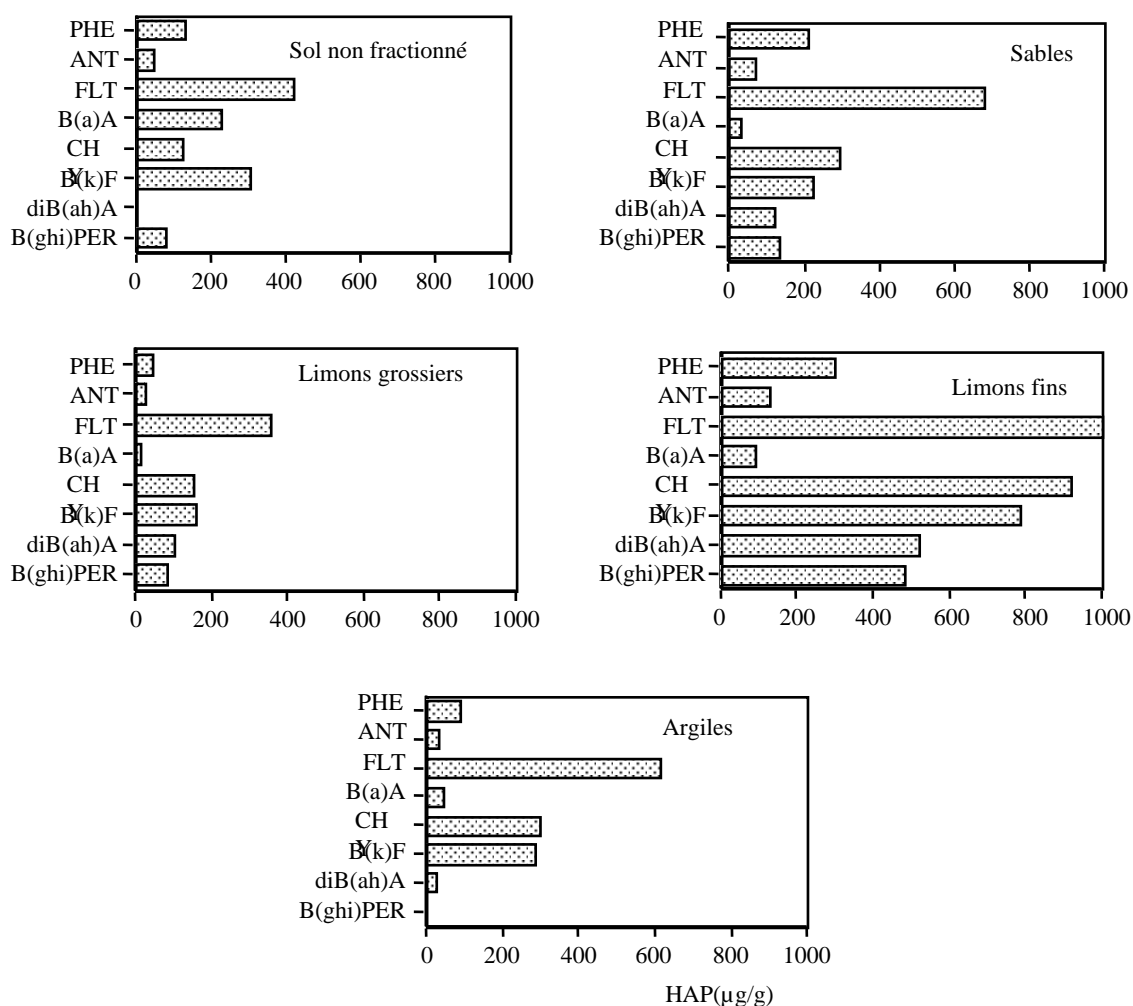


Figure 9 : Distribution et teneurs des HAP dans différentes fractions d'agrégats du sol industriel (SP) incubé en microcosme.

2) Dénombrement des communautés bactériennes (totales et dégradantes)

Dans les deux sols (SP et BF), l'étude a porté sur le dénombrement des communautés microbiennes totales et dégradant les HAP en observant leur croissance sur trois HAP (PHE,

ANT, FLU). Ces microflore ont été dénombrées sur le sol initial avant contamination et après amendement et différents temps d'incubation avec les HAP.

Ces dénombrements ont été effectués également sur les 4 classes d'agrégats dans le but d'établir des relations entre la localisation des polluants et celle des microflore, et de proposer des réponses ou des hypothèses concernant l'accessibilité et la biodégradation des HAP par la microflore autochtone.

2-a) Dénombrement au sein des agrégats du sol industriel

Les communautés bactériennes capables de dégrader les HAP dans le sol industriel (SP) comme dans le sol artificiellement contaminé (BF) ne sont pas réparties de façon homogène entre les 4 classes d'agrégats alors que, la microflore autochtone totale est distribuée de façon similaire pour toutes les fractions (figure 10).

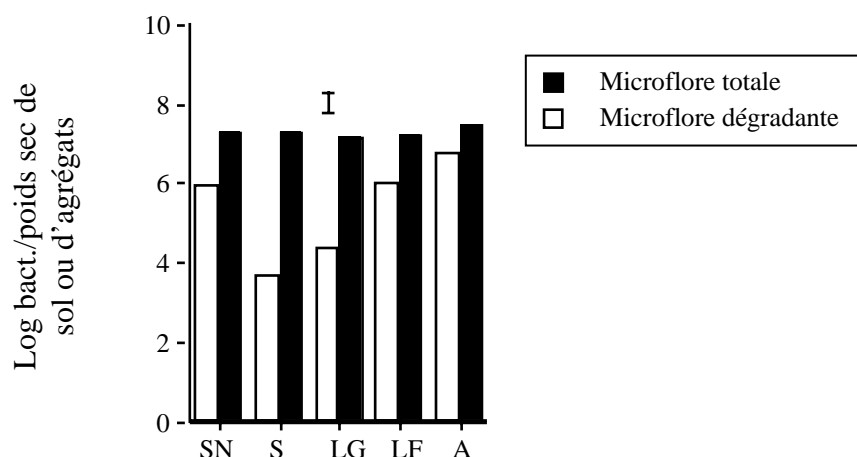


Figure 10 : Densité des bactéries autochtones (totales et dégradantes) dans le sol non fractionné(SN) et dans des différentes fractions d'agrégats du sol industriel (SP) incubé en microcosme.

Le nombre de bactéries capables de croître et d'utiliser au moins l'un des trois HAP (PHE, ANT, FLU) est plus élevé dans les fractions d'agrégats les plus fines (limons fins et argiles) que dans les autres fractions du sol industriel (SP). Ces bactéries dégradantes représentent respectivement, dans les deux fractions (LF et A) 6,5 et 19,7 % de la microflore totale. Dans les fractions grossières (sables et limons grossiers), les bactéries dégradantes sont moins nombreuses et représentent seulement $4,7 \times 10^3$ et $2,5 \times 10^4$ bact. g^{-1} du poids sec respectivement, dans les fractions S et les LG ce qui correspond à 0,02 et 0,13 % de la microflore totale.

2-b) Dénombrement dans les agrégats du sol artificiellement contaminé

Dans le sol contaminé de Bellefontaine (BF), le nombre ainsi que la distribution des communautés bactériennes particulièrement, les bactéries dégradantes sont fortement affectées par la présence des HAP dans le sol (figure 11). Une augmentation (d'une unité 1 log) dans la densité bactérienne des agrégats les plus grand (S) vers les agrégats les plus fins (LF et A) est observée entre 6 et 12 mois d'incubation (figure 11). Six mois après l'amendement et l'incubation du sol avec les HAP, les communautés bactériennes (totales et dégradantes) atteignent des nombres similaires dans les deux fractions fines du sol (LF et A). La fréquence des bactéries dégradantes par rapport à la microflore totale est plus faible dans les gros agrégats (40% dans les S et 10% dans les LG), mais ce pourcentage reste toujours plus élevé que celui déterminé dans le sol industriel (SP).

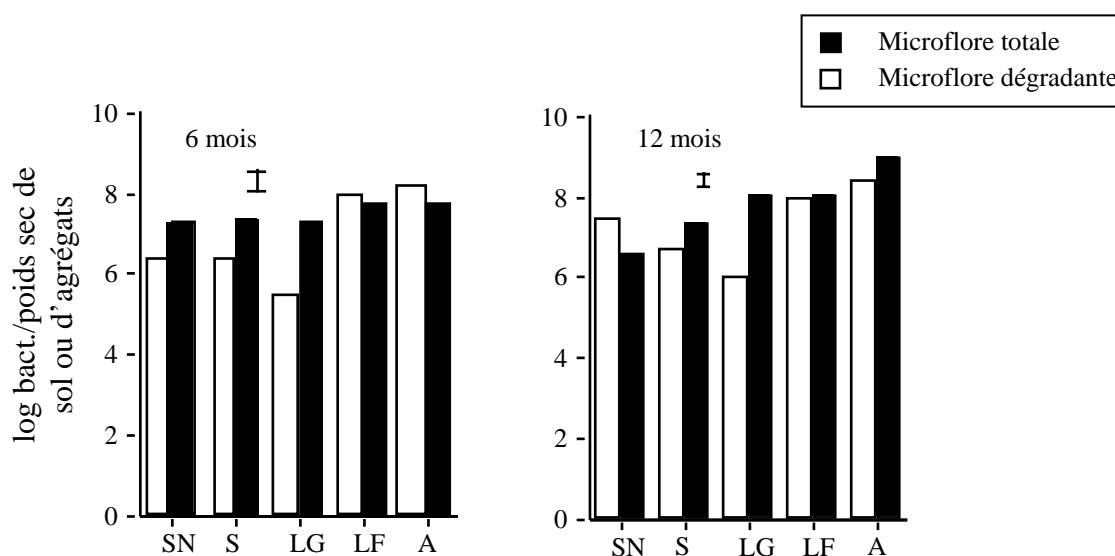


Figure 11 : Densité des bactéries autochtones (totales et dégradantes) dans les différentes classes d'agrégats du sol contaminé (BF) après 6 et 12 mois d'incubation en microcosme.

2-c) Dénombrement dans le sol sans fractionnement

Comme dans le cas de l'analyse des HAP, le nombre de bactéries mesuré dans le sol avant fractionnement est plus faible que celui détecté dans les fractions d'agrégats séparées et ceci dans les deux sols (SP et BF). L'amendement et l'incubation du sol BF en condition de microcosme n'a pas d'effet significatif sur la distribution de la microflore autochtone totale au sein des différentes fractions, la plus importante densité bactérienne (9×10^8 bact.

g^{-1}) est initialement observée dans la fraction $< 2 \mu m$ avant la contamination du sol. Néanmoins, la contamination du sol stimule le nombre des bactéries dégradantes dans le sol non fractionné (tableau 9). Le nombre de bactéries dégradantes dans le sol est initialement de l'ordre de 10^2 bact. g^{-1} (fréquence $< 0.01\%$ de la microflore totale), mais ce nombre augmente pour atteindre 3×10^7 bact. g^{-1} après six mois d'incubation du sol avec les HAP.

Tableau 9 : Nombre des bactéries hétérotrophes et des bactéries dégradant le phénanthrène ou un mélange de 3 HAP dans le sol de Bellefontaine non fractionné avant et après 6 mois d'incubation avec les HAP.

Traitement	Source de C dans le milieu de culture		
	Milieu complet NPP (log bact. g^{-1} sol)	3HAP NPP (log bact. g^{-1} soil)	PHE NPP (log bact. g^{-1} sol)
Sol non contaminé	$6,6 \pm 0,24$ a	$2,3 \pm 0,3$ b	$1,0 \pm 0,4$ c
Sol contaminé	$6,9 \pm 0,18$ a	$7,5 \pm 0,28$ a	$7,1 \pm 0,33$ a

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois répétitions avec l'erreur standard correspondante. Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0.05$, $n= 3$) selon le test de Newman-Keuls.

La proportion des bactéries dégradantes par rapport à la microflore totale est différente entre les deux sols (SP et BF). En effet, dans le sol artificiellement contaminé la densité bactérienne n'est pas statistiquement différente entre les deux communautés bactériennes, totales et dégradantes (tableau 9) alors que, dans le sol industriel, la fréquence des bactéries dégradantes par rapport à la microflore totale est inférieure à 10% (figure 10).

2-d) Influence de la nature du substrat (molécule de HAP) sur la croissance des bactéries

Les dénombrements réalisés en plaques de microtitration par la méthode NPP ont permis d'estimer la microflore capable de dégrader le FLU et/ou le PHE, de se développer en présence de l'ANT et potentiellement capable de le dégrader. Pour préciser la capacité des bactéries à dégrader un des hydrocarbures testés, il nous a paru important d'utiliser cette méthode en ajoutant un seul hydrocarbure au milieu de culture. Ainsi, le PHE a été choisi comme seule source de carbone dans le milieu de culture en plaque de microtitration du fait de son abondance dans le sol industriel et de l'intensité colorimétrique de ces produits

d'oxydation. En effet, ce substrat est initialement converti en acide 1-hydroxy-2-naphthoic (1H₂NA) qui est généralement accumulé dans le milieu et se manifeste par une couleur orange. Ce changement de coloration est mesuré par le lecteur de plaque à la densité optique DO 405 nm-620 nm.

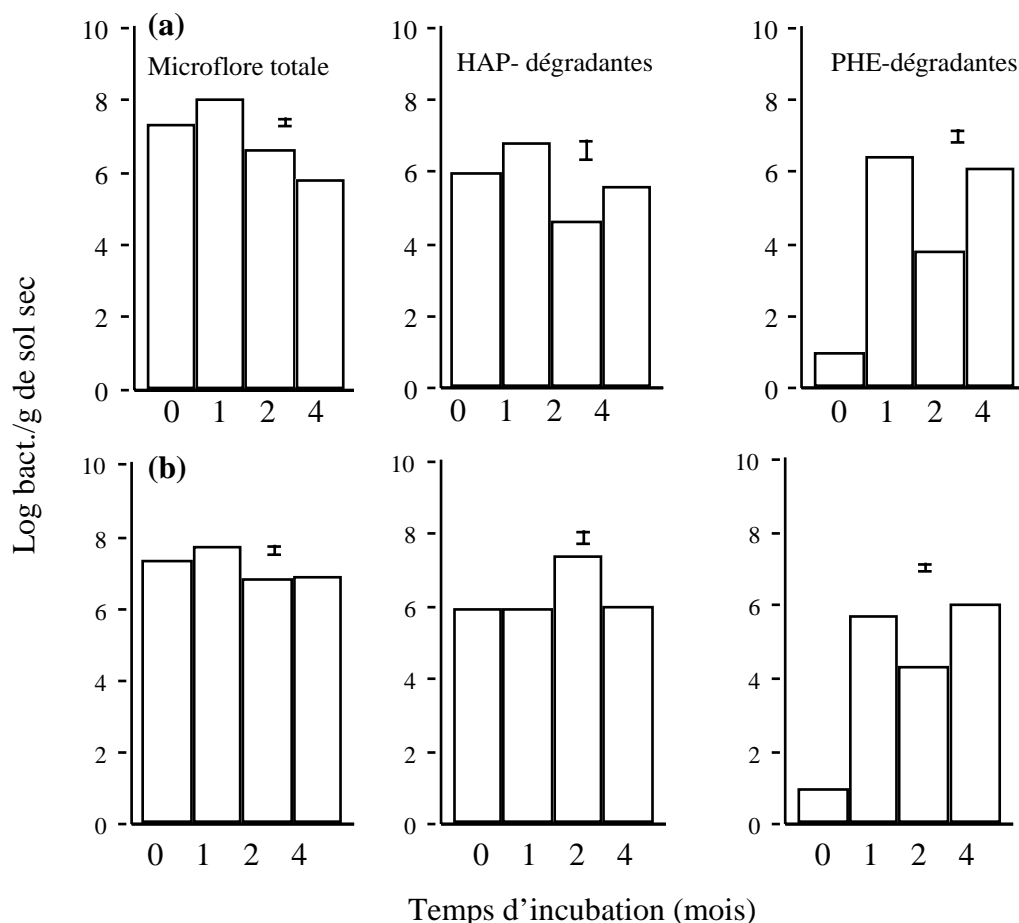


Figure 12 : Effet du mode d'incubation (a) batch et (b) microcosme sur le nombre des communautés bactériennes (totales, PAH-dégradantes et PHE-dégradantes) dans le sol industriel (SP).

Ainsi, le nombre de bactérie dégradant le PHE initialement dans le sol de Bellefontaine (BF) avant contamination est plus faible que celui détecté en présence des 3 HAP (tableau 9) mais, après six mois de contamination et d'incubation du sol avec les HAP, les bactéries PHE-dégradantes et celles utilisant les 3 HAP ont des densités similaires. Contrairement au sol artificiellement contaminé (BF), le sol industriel (SP) contient initialement avant son incubation un nombre élevé de bactéries compétentes, mais une faible densité en bactéries PHE-dégradantes (figure 12). Cette population bactérienne spécifique atteint le même nombre que les bactéries dégradant le mélange des 3 HAP après 1 mois d'incubation du sol

SP et ceci quelque soit le mode d'incubation (batch ou microcosme). Aucune différence dans le nombre des bactéries n'apparaît après 4 mois d'incubation (figure 12).

3) *Etude à l'échelle ultra-structurale des sols contaminés par les HAP*

Cette étude a consisté en une observation *in situ* des bactéries colonisant le sol de Bellefontaine contaminé par les HAP. Des coupes ultra-fines réalisées selon la méthode décrite par Villemin *et al.* (1987) ont été observées au microscope électronique à transmission (MET) (figure 13). Les bactéries qui ont été observées dans le sol BF se présentaient généralement sous des formes viables, d'une part séparées ou bien individualisées, libres ou en contact avec les composés organiques du sol, et d'autre part sous forme de micro-colonies plus ou moins enrobées par les matériaux des sols. Ces bactéries étaient le plus souvent entourées de composés probablement de nature polysaccharidique. Les bactéries généralement présentes dans ce sol possèdent des membranes épaisses avec des replis très denses aux électrons (figure 13).

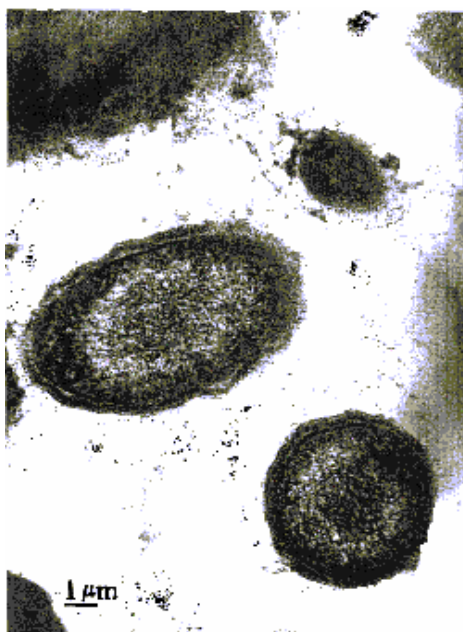


Figure 13 : Observation au MET de coupes ultra-fines du sol BF non fractionné et contaminé par des HAP.

Comme la cible principale des hydrocarbures, en terme de toxicité, semble être la membrane cytoplasmique, le mécanisme de résistance qui peut être développé par les bactéries pourrait être un accroissement de la rigidité membranaire (augmentation des acides gras saturés).

Par ailleurs, une observation de la microstructure des agrégats dans lesquels les microorganismes et substrats coexistent a été effectuée. Des coupes ultra-fines des agrégats de la taille des limons fins observées au MET montrent que les bactéries étaient présentes sous des formes libres ou en contact avec des composés organiques dans les agrégats du sol industriel (SP), contrairement à ceux du sol contaminé (BF) où les bactéries étaient à l'intérieur de l'agrégat sous forme de micro-colonies, le plus souvent entourées d'une matrice probablement de nature polysaccharidiques (Biofilm) (figure 14).

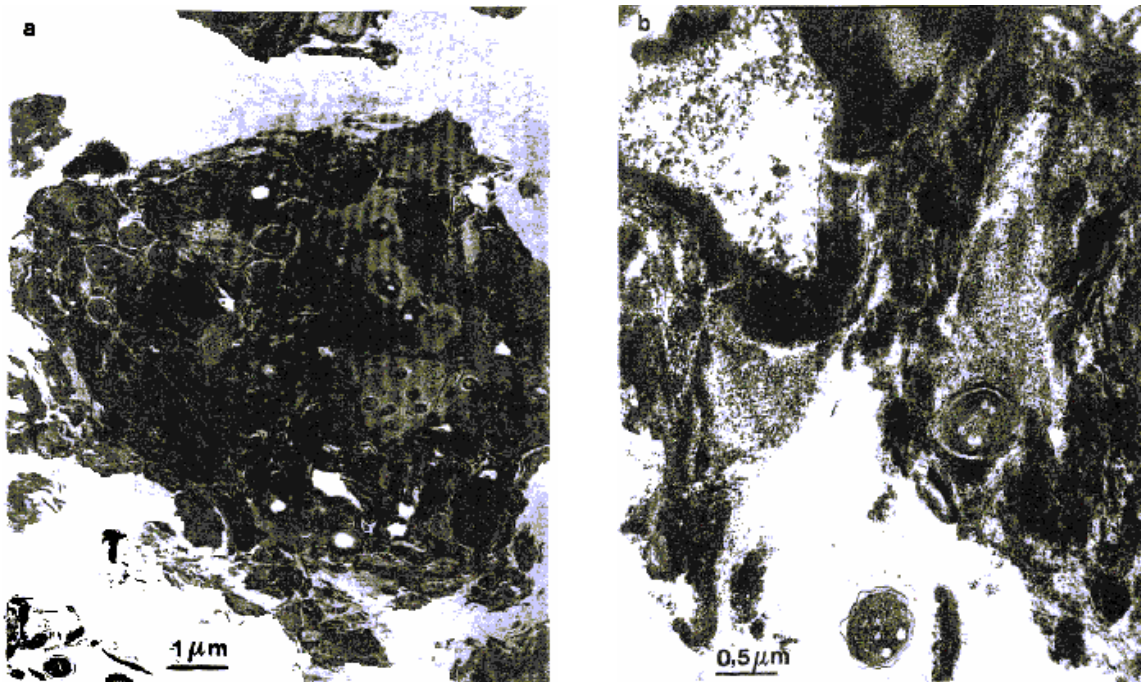


Figure 14 : Observation au MET des coupes ultra-fines des agrégats de la taille des limons fins (2-20 µm) du sol industriel SP (a) et du sol contaminé BF (b).

III.2.2. Rôle de certaines caractéristiques des sols dans la dissipation des HAP

La structure du sol et sa teneur en matière organique sont des paramètres importants à considérer lors de l'étude du devenir des HAP dans les sols. Ainsi, pour mettre en évidence les processus de stabilisation des HAP au sein des agrégats du sol dus à une protection physique et/ou un piégeage par les matières organiques, il nous a paru important de choisir

d'une part, un sol faiblement structuré et présentant des teneurs en C organique variables entre les classes d'agrégats et d'autre part, un sol bien structuré et ayant des teneurs en C organiques identiques dans les différentes classes d'agrégats.

Le sol dit de Bordeaux (sableux) et le sol dit de Riedhof (tourbe) présentent les caractéristiques nécessaires pour cette étude.

1) Biodisponibilité des HAP dans un sol sableux incubé en microcosme

La biodégradation et la répartition des HAP au sein de 4 classes d'agrégats ont été déterminées dans le sol de Bordeaux (BD) contaminé artificiellement par un mélange de 8 HAP et incubé en conditions de microcosme.

1-a) Analyse chimique

L'analyse du sol de Bordeaux (BD) non fractionné après 1 an de contamination montre que la teneur des HAP totaux extractible est de 0.47 g/Kg ce qui correspond à une diminution de l'ordre de 52 % dans la teneur des HAP dissipés.

Tableau 10 : Concentration des HAP exprimée en pourcentage (%) de la quantité initialement ajoutée au sol.

HAP	Teneur en % de la quantité initiale		Teneur ajoutée au sol (mg/Kg)	Teneur restante après 1 an (mg/Kg)
	6 mois	12 mois		
PHE	4,1	1,8	200	3,6
ANT	8,5	5,3	200	10,7
FLT	25	50,7	200	101,6
B(a)ANT	27	60,2	50	31,1
CHY	40	100	200	200
B(k)FLT	32	74,7	50	37,4
dB(a,h)ANT	39	95,8	50	47,9
B(g,h,i)PL	40	85,3	50	42,7

Considérant chaque molécule de HAP, la concentration du PHE et de l'ANT diminue rapidement durant les six premiers mois d'incubation alors que les autres molécules d'HAP sont faiblement extractibles (tableau 10). Le vieillissement de la contamination pendant 1 an entraîne une dissipation significative des molécules à faible poids moléculaires (PHE et ANT) et une forte extraction des HAP de 4, 5 et 6 noyaux aromatiques (tableau 10).

La concentration des HAP dans le sol avant fractionnement (tableau 10) est généralement plus faible que celle obtenue au sein de ces différentes fractions d'agrégats (figure 15). L'extraction des HAP semble, comme déjà observée, être efficace avec les fractions d'agrégats séparées dans ce type de sol aussi.

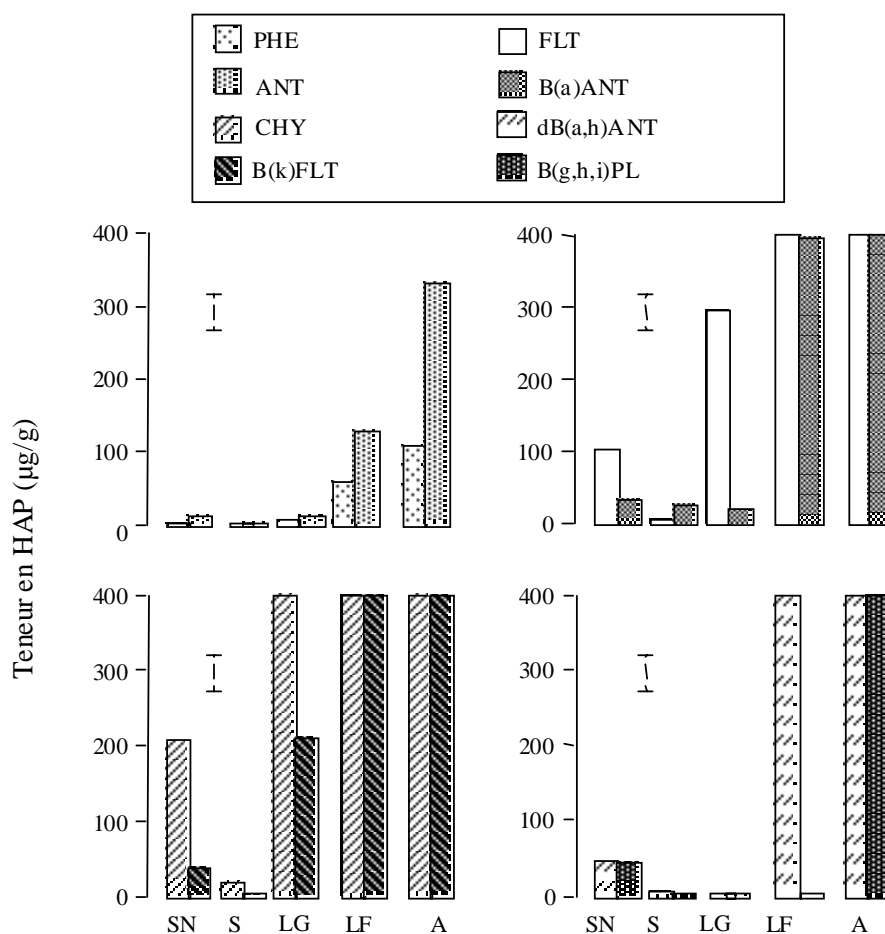


Figure 15 : Teneur et distribution des HAP dans le sol de Bordeaux non fractionné (SN) et ses fractions d'agrégats après sa contamination par les 8 molécules de HAP et incubation pendant 1 an en microcosme.

En considérant la teneur des HAP initialement ajoutée au sol, on constate après incubation que ces molécules sont principalement concentrés dans les fractions fines du sol (LF et A). La répartition de chaque molécule de HAP dans les 4 classes d'agrégats montre que, la fraction S ($> 50 \mu\text{m}$) est peu concentrée et les faibles teneurs concernent le PHE et l'ANT. Dans la fraction LG (20-50 μm), le CHY est majoritaire comme dans le cas de la fraction A ($< 2 \mu\text{m}$). Ce sont les fractions les plus fines (A et LF) qui contiennent pratiquement les 8 molécules d'HAP en plus fortes teneurs (figure 15).

Le profil de distribution des concentrations des différentes molécules de HAP semble être sensiblement le même dans les fractions granulométriques avec une distribution homogène des familles de HAP (3, 4, 5 et 6 cycles aromatiques).

Si on prend la molécule de PHE comme exemple, sa dissipation (différence entre la concentration initiale et résiduelle) dans le sol non fractionné est de l'ordre de 96 à 98 % respectivement, après 6 et 12 mois d'incubation (figure 16). Elle est extraite à une forte teneur dans la fraction A (108 $\mu\text{g/g}$), alors qu'elle est faiblement extraite dans la fraction S (0,5 $\mu\text{g/g}$). Cette fraction grossière qui représente 97 % de la masse de sol total (figure 16) ne contient que 34 % du PHE extractible, alors que 65,4 % de PHE restent dans les fractions fines (A et LF) qui constituent seulement 1,3% de la masse de sol.

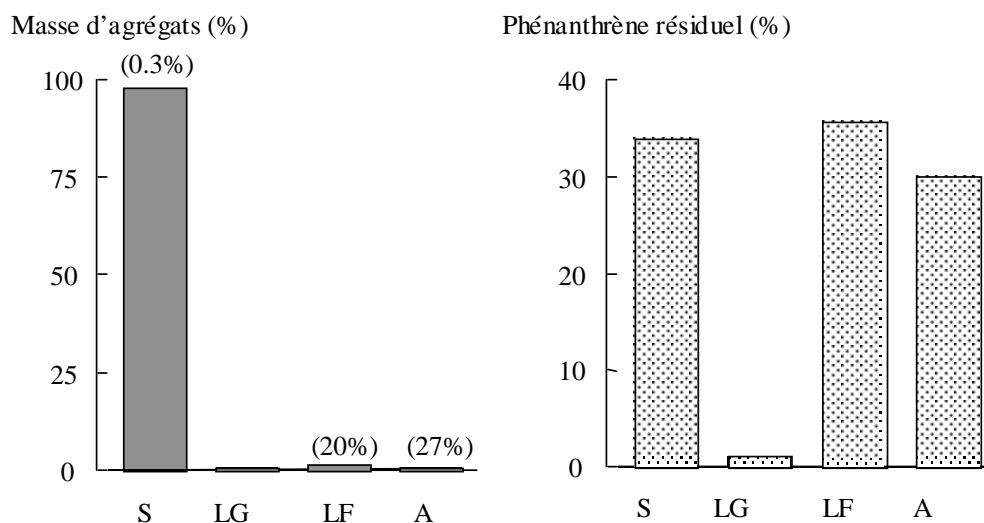


Figure 16 : Comparaison entre la masse des différentes fractions d'agrégats du sol de Bordeaux et leur quantité relative en phénanthrène et en carbone organique (la teneur en C est indiquée au dessus des histogrammes).

1-b) Caractérisation physique

Le fractionnement à l'eau du sol pour l'obtention des agrégats non perturbés a montré le caractère sableux du sol de Bordeaux avec un pourcentage en agrégats de la taille des sables de 98,3 %, de 1,3 % pour les limons et 0,45% pour les argiles (figure 16). La répartition de ces classes d'agrégats n'a pas été modifiée avec la contamination du sol et son incubation en microcosme à une humidité proche de la capacité au champ.

La teneur en Carbone organique de ce sol est très faible (< 1 %) néanmoins, la fraction argileuse essentiellement constituée de smectites contient 27 % de C correspondant à 32 % du C total dans le sol. Dans ce sol, la localisation des HAP résiduels semble être liée à la présence de la matière organique dans la fraction granulométrique fine.

1-c) Analyse microbiologique

Distribution et croissance des communautés bactériennes autochtones dans les agrégats :

La distribution des bactéries hétérotrophes au sein des 4 classes d'agrégats est affectée par l'amendement du sol en HAP. Une différence significative dans la densité de la microflore totale est observée entre le sol non contaminé et le sol après 1 an de contamination (figure 17). Avant la contamination du sol, la forte densité bactérienne a été détectée dans les agrégats de la taille des limons (LF et LG) et des argiles (1×10^8 bact./g de poids sec). L'incubation du sol contaminé pendant une année a entraîné une diminution (une unité 1 log) du nombre des bactéries hétérotrophes totales dans les limons fins contrairement aux sables où une nette augmentation de la microflore totale a été détectée (figure 17).

Par ailleurs, le sol avant contamination par les HAP semble avoir une microflore bactérienne capable d'utiliser le PHE comme source de carbone, sa densité est environ de 1×10^3 bact./g de sol sec (correspondant à une fréquence < 0.001% de la microflore totale). La contamination et l'incubation du sol avec un mélange de HAP stimule significativement le nombre de bactéries dégradant le PHE qui atteint 1×10^8 bact./g de poids sec dans le sol non fractionné. Il semblerait qu'une sélection ou une adaptation des populations bactériennes dégradant les HAP s'est produite dans le sol suite à son exposition aux HAP. Cette communauté bactérienne est initialement distribuée de façon homogène au sein des 4 classes d'agrégats (figure 17). Mais cette distribution change avec la contamination et l'incubation du sol avec les HAP, leur densité devient relativement plus importante dans les

agrégats de taille des sables > 50 μm (S) et des argiles comprise < 2 μm (A) que dans les agrégats de la taille des limons (LG) et (LF) 50-20 μm . Le nombre des bactéries dégradant le PHE est statistiquement identique dans les deux fractions de limons (LF et LG) (environ 1×10^6 bact./g de poids sec) alors que, leur pourcentage relative à la microflore totale est plus élevé dans les limons fins (40% de la microflore totale) que dans les limons grossiers (0.5% de la microflore totale) (figure 17).

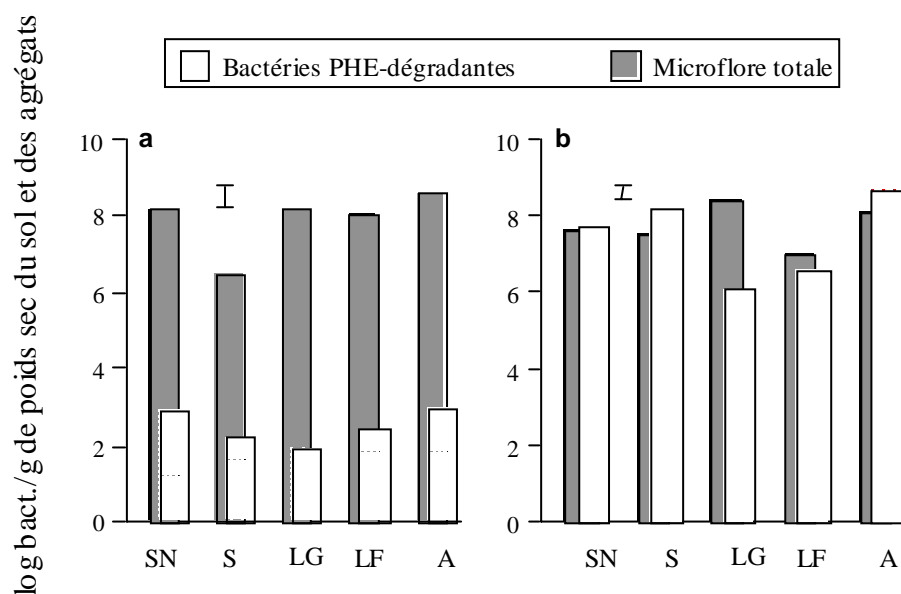


Figure 17 : Densité des communautés bactériennes autochtones (totales et dégradant le PHE) dans le sol non fractionné (SN) et ses différentes classes d'agrégats avant (a) et après 1 an (b) de contamination du sol de Bordeaux incubé en microcosme.

2) Dissipation des HAP dans un sol riche en matière organique

La biodégradation et la répartition des HAP au sein de 4 classes d'agrégats ont été déterminées dans le sol de Riedhof (RD) contaminé artificiellement par un mélange de 8 HAP et incubé en conditions de microcosme. L'effet du vieillissement de la contamination, sous des conditions expérimentales simulant l'atténuation naturelle et sur la dissipation des HAP a pu ainsi être observé.

2-a) Analyse chimique

La concentration des HAP totaux avant fractionnement du sol diminue de 75 à 90 % durant 1 à 2 ans d'incubation du sol contaminé (tableau 11). Les molécules d'HAP à 3 cycles

(PHE, ANT et FLT) atteignent des teneurs très faibles après 1 an et restent toujours détectables après 2 ans. La concentration des HAP à 4 cycles particulièrement, le B(a)ANT et B(k)FLT diminue fortement après 1 an (20 à 40 % de la concentration initial sont présent) pour atteindre une valeur très faible après 2 ans. Ceci est également le cas du dB(a,h)ANT dont la teneur restante après 1 an, 84 % par rapport à la concentration initiale, devient très faible après 2 ans d'incubation. Pour le CHY et le B(g,h,i)PL, des concentrations de 75 % sont présentent après 1 an et de 42 % et 58 % après 2 ans respectivement, pour ces deux molécules d'HAP (tableau 11).

Tableau 11 : Concentration des HAP dans le sol de Riedhof avant et après fractionnement à 1 et 2 ans d'incubation en microcosme.

HAP	Teneur initiale ajoutée (mg kg ⁻¹)	Temps d'incubation (années)	Teneur de HAP	
			Sol non fractionné (mg kg ⁻¹)	Sol fractionné (mg kg ⁻¹)
PHE	200	1	1,0	0,5
		2	1,0	0,2
ANT	200	1	2,0	0,5
		2	1,0	0,4
FLT	200	1	4,0	2,6
		2	1,0	1,4
B(a)ANT	50	1	10	3,0
		2	0,5	0,8
CHY	200	1	148,0	59
		2	85,0	67
B(k)FLT	50	1	19,3	13
		2	2,6	4,0
dB(ah)ANT	50	1	42,0	20
		2	1,0	17
B(ghi)PL	50	1	37,0	17
		2	28,6	18
HAP totaux	1000	1	263	116
		2	121	109

Après fractionnement du sol en différentes classes d'agrégats, la concentration total des HAP apparaît très élevée dans les plus petits agrégats à la fois après 1 et 2 ans d'incubation, mais la différence relative entre tailles d'agrégats diminue avec le temps (figure

18). Cette différence est due à une diminution de la concentration des HAP dans les petites classes d'agrégats de petites tailles (LF et A) puisque la teneur dans les gros agrégats (S et LG) diminue relativement peu entre 1 et 2 ans d'incubation du sol.

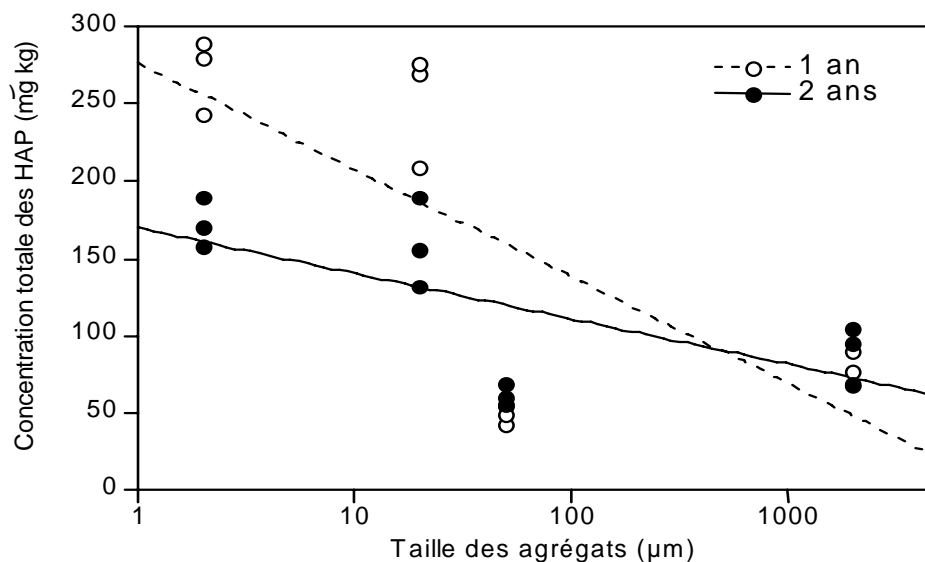


Figure 18 : Concentration totale des HAP dans différentes classes d'agrégats du sol de Riedhof après 1 et 2 ans d'incubation en microcosme.

La concentration de chaque molécule d'HAP dans chacune des 4 classes d'agrégats, à quelques exceptions près, ne suit pas le mode de dissipation observé dans le sol avant fractionnement (figure 19). Généralement, la plus forte concentration d'HAP est observée dans les petits agrégats et la vitesse de dissipation entre 1 et 2 ans d'incubation est également relativement plus élevée dans les agrégats de petite taille.

Cette tendance général ne concerne pas toutes les molécules d'HAP, comme le cas du B(k)FLT dont la forte concentration ainsi que la forte vitesse de dissipation se trouve principalement dans la fraction d'agrégat de taille 20-50 µm (LG). Le CHY présente une distribution voisine entre les différentes classes d'agrégats et avec des teneurs qui varient peu entre 1 et 2 ans d'incubation. Pour les HAP à fort poids moléculaire « plus récalcitrant » (dB(a)ANT et B(g,h,i)PL), les teneurs dans les fractions fines dépassent la concentration initiale du sol total. Cette forte concentration ne change pas pour le B(g,h,i)PL après 2 ans d'incubation dans la fraction < 2 µm.

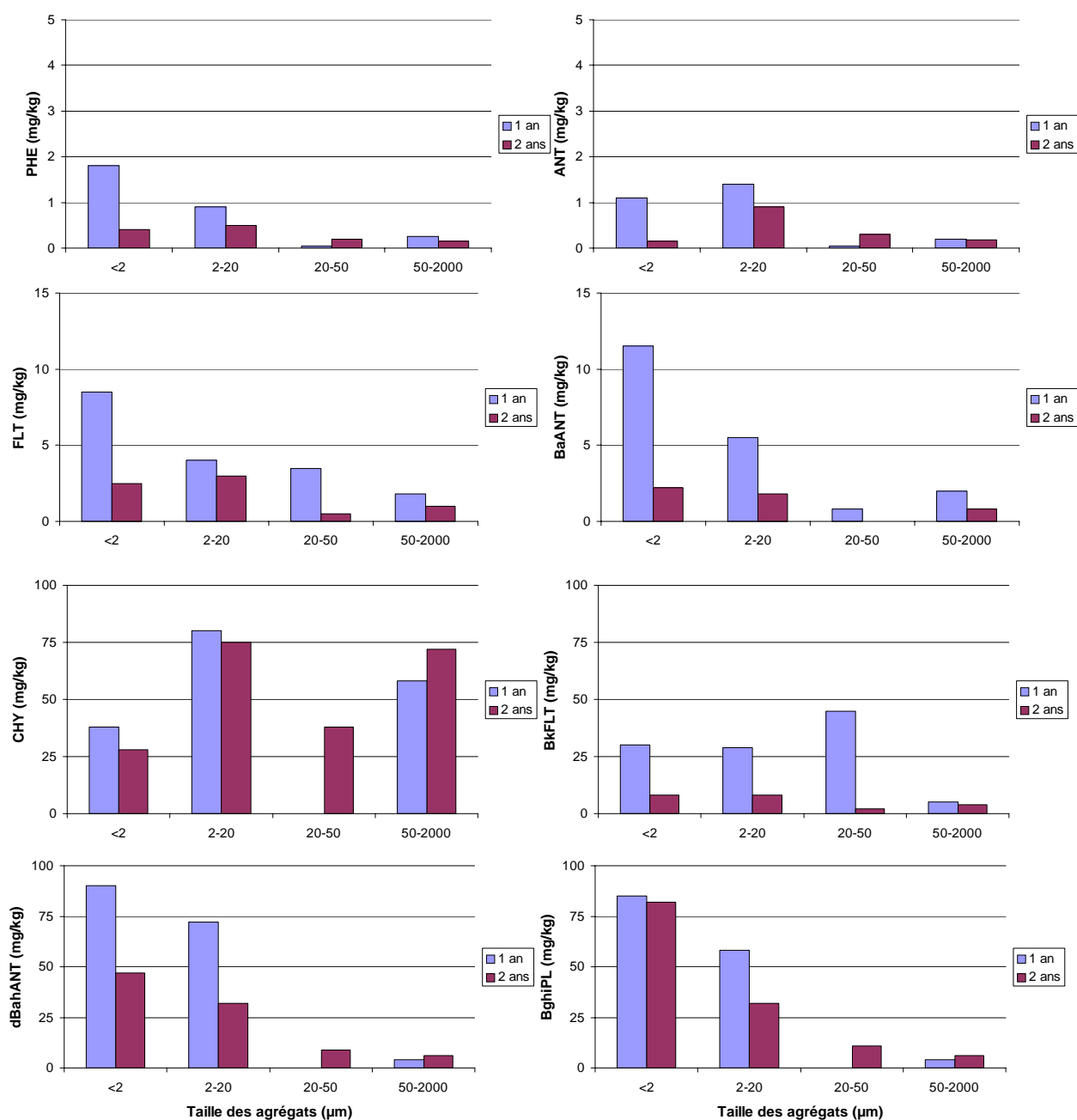


Figure 19 : Evolution de la teneur des HAP dans les agrégats après 1 et 2 ans d'incubation du sol de Riedhof contaminé.

Un bilan effectué en tenant compte de la masse de chaque fraction d'agrégat fait apparaître que, les molécules d'HAP à 3 cycles sont toujours détectées à faibles teneurs dans le sol avant fractionnement et dans le sol fractionné (concentration d'HAP dans l'agrégat x masse de la fraction d'agrégats) (tableau 11). Pour le B(a)ANT et le B(k)FLT, des faibles concentrations, mais différentes pour ces deux composés, ont été détectée après fractionnement du sol à 1 an

La distribution primaire des particules de sol (fractionnement aux résines cf § tableau 3) est différente, ce sont les argiles qui sont les plus abondants et représentent 50% de la fraction minérale ainsi que les limons fins (30%).

De même, la teneur en carbone organique du sol RD (22% dans le sol total) varie considérablement entre les différentes classes d'agrégats. Les fractions d'agrégats < 2 µm et de 2-20 µm contiennent respectivement, 15 et 19 % de C, alors que dans les fractions grossières le carbone est distribué de façon non homogène ; 8 % de C dans la fraction 20-50 µm et 22 % dans la fraction > 50 µm.

2-c) Analyse microbiologique

Les résultats du dénombrement des bactéries dégradantes (NPP) montrent que, le sol de Rhiedof (RD) avant amendement par le HAP possède 5×10^2 bact. g⁻¹ du sol sec, ce qui correspond à 0,01% du nombre total des bactéries hétérotrophes (tableau 13). La contamination du sol par les HAP augmente le nombre des bactéries dégradantes à environ 1×10^7 bact. g⁻¹ du sol sec après 12 mois d'incubation. Cette densité bactérienne n'augmente pas significativement durant la deuxième année d'incubation. L'amendement du sol et son incubation avec les HAP n'affecte pas significativement le nombre de la microflore total.

Tableau 13 : Evolution quantitative des communautés bactériennes du sol de Riedhof non fractionné durant son incubation.

Groupe bactérien	Temps d'incubation (années)	NPP (log bact.g ⁻¹ poids sec)
HAP-dégradantes	0*	2.7 ± 0.10 a
	1	6.9 ± 0.20 b
	2	7.3 ± 0.30 b
microflore totale	0	6.7 ± 0.22 b
	1	7.1 ± 0.20 b
	2	7.5 ± 0.24 b

Chaque valeur correspond à la moyenne de trois répétitions avec l'erreur standard correspondante. Les valeurs suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($P < 0.05$, $n = 3$) selon le test de Newman-Keuls.

(*) : sol avant amendement en HAP

La distribution des communautés bactériennes, en particulier les bactéries dégradant les HAP, au sein des fractions d'agrégats change significativement durant l'incubation du sol (figure. 20). Le nombre des bactéries hétérotrophes totales augmente significativement dans les fractions d'agrégats de la taille des sables et des limons fins. Dans les autres fractions d'agrégats cette tendance s'observe mais n'est pas significative. Par ailleurs, le nombre des bactéries dégradantes est significativement plus élevée dans les fractions de sables et d'argiles que dans les fractions de limons après 1 an d'incubation. Après 2 ans d'incubation du sol contaminé, le nombre de bactéries dégradantes n'augmentent pas comme la microflore totale. Elles présentent des valeurs similaires dans l'ensemble des fractions d'agrégats de la taille des sables (8×10^6 bact. g^{-1} du poids sec), les limons fins (2×10^7 bact. g^{-1} du poids sec) et les argiles (3×10^7 bact. g^{-1} du poids sec). On note une tendance à l'accroissement dans les fractions limons seulement. Leur proportion relative à la microflore totale est néanmoins plus faible dans les fractions de sables et limons fins (respectivement, 8 et 3,2 % de la microflore totale) que dans les agrégats argileux (16 % de la microflore totale). Ces bactéries dégradantes représentent 5×10^5 bact. g^{-1} du sol sec (6.3 % de la microflore totale) dans les agrégats de limons grossiers après 1 an d'incubation du sol et atteignent 2×10^6 bact. g^{-1} du poids sec (4 % de la microflore totale) après 2 années d'incubation. Cependant cette valeur reste toujours plus faible par rapport à celle des autres classes d'agrégats.

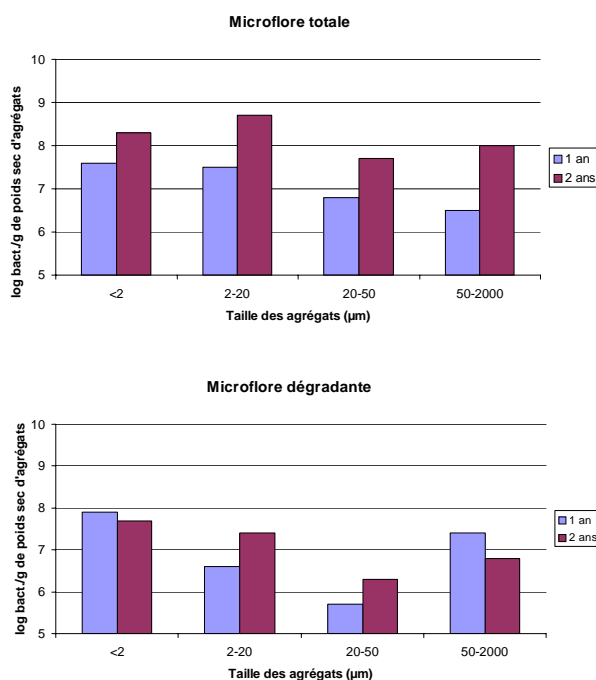


Figure 20 : Distribution et densité des communautés bactériennes (dégradantes et totales) au sein de différentes fractions d'agrégats après 1 et 2 ans d'incubation du sol de Riedhof contaminé.

IV. Discussions

Le terme de dissipation des contaminants organiques des sols englobe plusieurs mécanismes de disparition d'agents polluants dans un sol. Pour les polluants organiques, il comprend la solubilisation, la photo-oxydation, la volatilisation et la biodégradation. Dans notre étude, les échantillons de sol étant incubés à l'abri de la lumière, la photo-oxydation est un mécanisme qui n'a pas été pris en compte. De même, la volatilisation qui ne concerne que les HAP les plus légers a été négligée car ces molécules n'étaient pas présentes dans les sols. La solubilisation, *i.e.* le passage des HAP en solution, est extrêmement faible; ceci est évidemment dû aux faibles coefficients de solubilité des HAP dans l'eau (e.g. 1,29 mg/l pour le phénanthrène cf. § tableau 1). La bio-transformation ou la biodégradation pourraient alors expliquer la dissipation observée des HAP dans notre étude. Les caractérisations biochimiques de ces processus implique le dosage des HAP extractibles restant dans les sols après leur incubation en microcosme proches des conditions naturelles. En effet, la recherche des métabolites de dégradation dans des mélanges de HAP dans le sol est très complexe en raison de difficultés d'extraction et de limites de détection et ne permet guère un suivi global .

Les résultats obtenus dans cette première partie de l'étude ont d'abord concerné la caractérisation d'un sol industriel pollué SP en distinguant (a) les propriétés chimiques : nature et extractibilité des polluants considérés comme représentatif, (b) les propriétés physico-chimiques : organisation des agrégats (texture et structure), teneurs en MO et (c) les propriétés biologiques : nombre des communautés bactériennes autochtones (dégradante et totale).

La caractérisation chimique a montré que les HAP dans un sol industriel pollué (SP) ne se répartissent pas uniformément dans les différentes fractions granulométriques, ou classes d'agrégats. Parmi les agrégats correspondant à différentes tailles et structures (sables, limons grossiers, limons fins, argiles) ce sont les agrégats de la taille des limons fins (2-20 μ m) qui présentent la plus forte teneur. Cette répartition sélective, se retrouve 6 mois après une contamination expérimentale d'un sol de type voisin (Bellefontaine). Certains composés comme le fluoranthène, abondant dans toutes les fractions du sol pollué SP, apparaissent plus récalcitrants, même si les HAP résiduels sont, dans ces deux sols, des composés à nombre de cycles plus élevé.

La densité des microorganismes (bactéries essentiellement) varie aussi en fonction de la taille des agrégats (classes granulométriques). Pour le sol industriel SP, elle est plus importante dans les agrégats les plus fins (A et LF) où les HAP sont relativement plus abondants.

L'ensemble de ces résultats, résumés très succinctement, ont conduit à diverses conclusions, remarques et questions portant essentiellement sur (i) la répartition et la stabilisation des HAP dans les sols industriels pollués, (ii) la répartition et l'activité des microorganismes, (iii) les relations entre présence et activité des microorganismes et (iv) les principaux facteurs limitant ou accélérant la biodégradabilité, etc. Certaines de ces questions et hypothèses ont été vérifiées dans des sols expérimentalement contaminés choisis pour leurs propriétés physico-chimiques représentatives, proches du sol industriel étudié, montrant des répartitions différentes de matières organiques et présentant des structures et pH contrastés.

IV.1. Sol industriel pollué

IV.1.1. Etude de la localisation des HAP et des microorganismes responsables de la biodégradation

Les résultats de l'analyse des HAP ont montré une distribution non homogène entre les agrégats de différentes tailles et au sein de chaque classe d'agrégat. Ce sont les petits agrégats (limons et argiles) qui représentent des teneurs élevées en HAP et en bactéries dégradantes. Ce résultat atteste d'une faible séquestration des HAP dans les agrégats de la taille des sables alors que, les agrégats les plus fins possèdent une microflore plus abondante et qu'ils pourraient être considérés plus favorable pour le métabolisme bactérien. Ceci peut être expliqué par une séquestration plus efficace des bactéries dégradantes et des produits organiques à dégrader dans les agrégats de petites tailles à capacité plus réactives. mais aussi par la capacité de rétention plus limitée des agrégats de la taille des sables. Des travaux ont montré que l'effet de la taille des agrégats sur la dégradation des polluants se manifeste au niveau de la surface spécifique qui reflète la capacité à fixer les bactéries et les contaminants en fonction de sa taille et contribue à l'accessibilité aux polluants et leur dégradation (Stella et al., 1990) de grandes surfaces spécifiques et micro-porosités favoriseraient la rétention. Ceci concerne les HAP localisés à l'extérieur des agrégats comme par exemple sur ceux de la taille des sables. En revanche ceux présents à l'intérieur des agrégats sont protégés physiquement et sont faiblement accessibles aux microorganismes et leur enzymes (Steinberg et al., 1987;

Rijnaarts et al. 1990) comme c'est le cas des petits agrégats. Les matières organiques, les constituants inorganiques comme les argiles et les oxyhydroxydes sont probablement impliqués dans la stabilité des HAP au sein des sols en raison de leur forte réactivité physico-chimique (Means et al., 1980 ; Chiou et Shoup, 1985 ; Knaebel et al., 1996).

IV.1.2. Effet du mode d'incubation du sol industriel sur la biodégradation des HAP

L'incubation du sol industriel pollué en conditions de suspension dans l'eau sous agitation entraîne une désagrégation du sol et rend les HAP plus disponibles aux microorganismes. En comparant ce mode d'incubation(batch), qui présente des avantages au niveau température et disponibilité d'O₂, par rapport aux incubations en microcosme on constate que, la dissipation des HAP ne concerne que les molécules à 3 cycles aromatiques et le B(a)ANT. Les HAP à 4 et 5 cycles aromatiques ne semblent pas affectés par ce mode d'incubation toutefois, l'augmentation de leur extraction suggère leur libération soit physique soit liée à la biodégradation des matières organiques. La dégradation des molécules de HAP à fort poids moléculaire (4 ou plus de noyaux aromatiques) par les microorganismes autochtones est toujours plus faible que celle des molécules à faible poids moléculaire (Shiaris, 1989; Wild et Jones, 1993). Le suivi de l'extraction des molécules de HAP en fonction du temps d'incubation du sol dans des conditions en batch montre que les molécules les plus récalcitrantes ne sont extraites que lorsque les HAP les plus solubles sont dégradés (Mueller et al., 1989). Ceci montre que les molécules d'HAP les plus solubles passent en solution et sont préférentiellement dégradés par les microorganismes.

L'analyse des HAP après extraction sur les fractions séparés d'agrégats du sol montre que l'extraction est plus efficace que sur le sol total. En effet, l'analyse après extraction sur le sol total, révèle une plus faible teneur en HAP comparativement aux résultats cumulés des extraits sur les différentes classes d'agrégats. Le fractionnement granulométrique du sol accroît la surface d'échange et rendrait plus accessible les HAP à l'extraction (Guggenberger et al., 1996). La différence non significative de la dissipation des HAP entre les deux régimes d'incubation (batch et microcosme) du sol industriel (SP) indique que la protection physique des HAP au sein des agrégats n'est pas le seul facteur dominant contrôlant la disponibilité et la dégradation des HAP. La dissipation rapide des HAP dans le sol artificiellement contaminé (BF) par rapport au sol industriel suggère que le vieillissement contrôle aussi fortement l'accessibilité des HAP aux microorganismes. Un résultat similaire à

été obtenu avec une molécule facilement dégradable par les microorganismes, le PHE, qui a été fortement dégradé après son apport à un sol industriel pollué par rapport au PHE anciennement présent dans le sol (Morgan et al., 1992).

IV.1.3. Essai de définition des relations entre extractabilité et biodégradabilité des HAP

Une caractérisation de la rétention des HAP par le sol industriel pollué (SP) a été abordée en suivant les cinétiques de mise en solution à l'eau des HAP du sol. Comme l'extractabilité des HAP peut dépendre de la localisation des ces polluants au sein de la matrice sol et leur piégeage au sein des MO, les cinétiques de mise en solution des HAP ont été déterminées dans le sol non fractionné et dans deux classes d'agrégats de tailles (2000-50 μm et 2-20 μm) et de teneurs en C organique très différentes (respectivement, 14,5 et 26 %). Les résultats ont montré que les HAP sont "désorbables" à l'eau mais pour des quantités et avec des cinétiques qui dépendent de la nature la molécule et de celle des agrégats. La solubilité est plus importante et plus rapide dans les agrégats de la taille des limons (Figures 4 et 5).

Par ailleurs, les essais de biodégradation en relation avec l'extractabilité (ou teneur des HAP) dans le sol industriel en fonction du mode d'incubation (batch ou microcosme) ont montré des phases d'augmentation des teneurs en anthracène et phénanthrène extractibles dans ce sol SP auxquelles correspondent aussi des accroissements des peuplements microbiens suivis d'une diminution de ces valeurs. Il semblerait donc que les quantités de HAP (phénanthrène, anthracène et fluoranthène) extractibles augmentent dans une première phase liée à la mise en place de conditions de dégradation favorisant leur extractabilité, soit par biodégradation des matières organiques pièges, soit par production de substances tensio-actives. Cette phase initiale favoriserait leur bio-disponibilité et biodégradation qui se traduisent alors par une diminution de leur teneur dans le milieu (quantités extraites plus faibles) après différents temps et selon le mode d'incubation.

Sur un sol industriel pollué, les cinétiques de biodégradation ne peuvent être définis aussi précisément que les cinétiques de désorption-extraction. Des indices de biodégradation, pourraient être établis à partir d'un "invariant" obtenu au cours des extractions. Des relations entre cinétiques d'extraction (ou désorption à l'eau) et biodégradation ne sont pas précisément établies après 4 mois d'incubation du sol en suspension dans l'eau (incubation en batch).

Toutefois la biodégradation déterminée par le suivi des teneurs des HAP suit, au moins en partie, l'ordre de dissolution-extraction à l'eau.

Ce type d'étude devrait être conduit sur un système expérimental mieux contrôlable que le sol industriel pollué dans lequel on observe des ordres de "désorption-extraction" qui, avec l'eau, donne le classement suivant : phénanthrène > fluoranthène > anthracène > chrysène = benzo(k)fluoranthène que l'on retrouve avec les agrégats de la taille des sables et des limons fins. Les autres molécules ne sont pas décelables dans ces extractions à l'eau.

Une étude préliminaire visant à tester le pouvoir absorbant de la matière organique du sol de Bellefontaine (BF), sol assez voisin du sol industriel (SP), a été menée en contaminant le sol BF avec un extrait chloroformique contenant des HAP provenant du sol industriel. La désorption (mise en solution dans l'eau) de ces HAP après 48 h de contamination du sol BF a montré, une forte capacité de rétention de ce sol vis à vis des HAP. En effet, les pourcentages de HAP désorbés par rapport à la quantité initialement introduite étaient relativement faibles : environ 0,06 ; 0,05 ; 0,01 ; 0,36 et 0,002% respectivement, pour le PHE, l'ANT, le FLT, le CHY et le B(k)FLT. L'ordre de "désorption-extraction" trouvé dans le sol industriel (SP) s'est pratiquement manifesté dans le sol contaminé (BF) à l'exception du CHY. Il serait particulièrement intéressant de déterminer plus précisément cette capacité d'adsorption des matières organiques des sols.

IV.2. Sols contaminés artificiellement

La contamination expérimentale de trois sols (BF, BD et RD) aux propriétés différentes (pH, structure, texture, teneur en matières organiques, teneur en carbonates...) par un mélange de 8 molécules d'HAP dont la teneur totale est de 1‰ (phénanthrène, anthracène, fluoranthène, chrysène, benz(a) anthracène, benzo(k)fluoranthène, dibenz(a,h) anthracène, benzo(g,h,i,)perylène) et leur mise en incubation en conditions d'humidité voisines de la capacité au champ et à des températures variables durant l'année entraîne d'abord une modification de la structure et de la texture des sols. On constate en effet une modification sensible de la répartition des fractions fines pour les agrégats de la taille des argiles (0-2 µm) et des limons fins (2-20 µm) en particulier.

Cette modification peut être liée aux manipulations du sol et à sa préparation pour les expériences de contamination par l'apport de HAP, mais aussi aux phénomènes de

biodégradation des matières organiques qui entraîneraient une dégradation des composés humiques et des HAP impliqués dans la stabilisation des agrégats des sols. En effet, le fractionnement physique par dispersion à l'eau du sol de Riedhof d'incubation a montré une augmentation des fractions d'agrégats fins et une diminution des fractions d'agrégats grossiers entre 1 et 2 ans (c.f. tableau 12)

IV.2.1. Comportement des HAP durant le vieillissement de la contamination des sols

Suite à cette contamination de trois sols aux propriétés différentes, les HAP sont tous extractibles 24 h après cette pollution expérimentale. Puis l'extractibilité des HAP décroît dans ces sols incubés en microcosme. Dans ces expériences, l'extractibilité minimum des HPA est observée après 6 mois de mise en incubation et elle est plus importante pour les trois sols après 1 an de contamination et de mise en incubation. Cette extractibilité de l'ensemble des HAP limitée dans les trois sols étudiés est variable selon le type de sol (tableau 14).

Tableau 14 : Extractibilité de l'ensemble des HAP par rapport au total introduit (en %) après 6 et 12 mois d'incubation.

% de HAP extractible	Riedhof	Bordeaux	Bellefontaine
6 mois	13,9	22,3	24,2
12 mois	25,0	58,5	30,0

Cette variation de l'extractibilité en fonction de la durée de la pollution correspond au phénomène dit de vieillissement "ageing" qui actuellement est toujours mal défini. Des phénomènes de fixation des HAP sur les constituants du sol ou piégeage dans les structures micro-poreuses du sol et leur stabilisation dans les agrégats sont en cause. Ces phénomènes sont liés à plusieurs processus :

Des processus physico-chimiques et physiques tel les phénomènes d'adsorption-désorption et de diffusion qui sont sous la dépendance des alternances de dessiccation-humification du sol (les sols étaient réhumidifiés au cours de leur incubation)

Des processus microbiologiques à savoir : (i) la biodégradation microbienne de matières organiques qui peuvent agir comme piège des HAP ou comme stimulant de l'activité microbienne, (ii) la production de substances à propriété tensio-active par la microflore

autochtone, et (iii) les modifications des constituants du sol par l'activité microbienne entre autres.

Ces phénomènes de vieillissement modifient donc l'extractabilité, et conduit à des évaluations variables de la teneur et la biodégradation des HAP dans les sols. La connaissance de ces processus mérite d'être améliorée pour définir et mesurer plus précisément l'atténuation naturelle des HAP ou autres polluants organiques.

L'extractabilité qui est à la base de la mesure des HAP résiduels doit être interprétée avec précaution en tant qu'outil préparatif de l'évaluation de la dégradation des HAP. Dans l'état actuel de l'étude, cette "extractabilité différentielle" entre les sols étudiés ne peut pas être reliée précisément aux propriétés de ces sols : teneurs en matières organiques, teneurs en argiles, taille des agrégats majoritaires (c'est-à-dire texture et structure des sols), pH etc. Toutefois, en considérant les quantités résiduelles de HAP, on peut proposer des biodégradations plus importantes dans les sols de Riedhof (RD) et de Bellefontaine (BF) tous deux plus riches en matières organiques et à pH plus élevé (présence de carbonates). Une cinétique plus complète aiderait à préciser ces phénomènes. Des mesures devraient être faites sur des temps plus longs pour préciser les phénomènes "d'atténuation" naturelle et en utilisant des molécules marquées plus faciles à suivre.

Le rôle de la matière organique, tant pour les phénomènes de stabilisation-accumulation des HAP et leur vieillissement que pour les phénomènes de biodégradation des HAP, mérite d'être étudié et bien défini en raison de l'importance des liaisons organiques et de leur stabilité insuffisamment connues actuellement.

Ce sont les HAP à nombre limité de cycles (3 et éventuellement 4 cycles) qui sont présents en quantités moindre ou qui ne sont pas ou plus extraits de certaines fractions granulométriques ou classes d'agrégats. Ainsi, ils apparaissent bien comme les plus biodégradables en particulier le phénanthrène et l'anthracène. Le fluoranthène et le benz(a)anthracène apparaissent aussi en plus faibles quantités dans les extraits (par rapport à l'apport initial) et semblent donc aussi relativement plus biodégradables. En revanche, le chrysène, le benzo(k)fluoranthène, le dibenz(a,h)anthracène, le benzo(g,h,i)perylène paraissent peu ou pas dégradables sur les temps de contamination considérés (1 à 2 ans) et dans les conditions adoptées qui sont des conditions que l'on peut qualifier de naturelles.

Les HAP se répartissent différemment dans les différentes classes d'agrégats. Les teneurs en HAP sont le plus souvent et relativement plus élevées dans les agrégats de plus petite taille. Ainsi, les agrégats de la taille des limons fins (2-20 μm) possèdent, pour le sol de Bellefontaine (BF), voisin du sol industriel, les teneurs les plus élevées et représentent aussi la fraction qui contient relativement la plus grande partie des HAP.

Pour les autres sols, les teneurs en HAP sont les plus élevées dans les agrégats de la taille des limons fins et des argiles. Toutefois, d'un point de vue quantitatif, les plus grandes quantités de HAP sont présentes dans la fraction des limons fins pour le sol de Riedhof (RD) et dans celle des limons fins et argiles pour le sol dit de Bordeaux (BD). Dans le sol de Bordeaux, un traitement mécanique lié à l'élimination des argiles et des limons fins, qui ne représentent que de l'ordre du pourcent de la masse de sol total, éliminerait la plus grande partie (environ les trois quart) des HAP. Ce type d'intervention peut sans doute être envisagée dans certains traitements pour cette classe de sol ou des sols de caractéristiques physiques voisines.

La forte teneur en C organique dans la fraction argileuse ainsi que la nature du minéral (essentiellement des argiles de type smectites) et sa forte surface spécifique peuvent contribuer à la formation du comportement d'HAP résiduel dans ce type de sol (Stella *et al.*, 1990 ; Richnow *et al.*, 1999).

Les HAP semblent aussi avoir une répartition qui dépend de la nature de la molécule et du type d'agrégats. Par exemple, le benz(a)anthracène se retrouve sur les agrégats de la taille des sables qui sont des particules quartzieuses dans le sol de Bordeaux. Alors que dans le même sol le benzo(g,h,i)perylène se retrouve plus particulièrement associé aux agrégats de la taille des argiles.

Ces possibilités d'associations, en fonction de la nature des agrégats et de la nature des molécules concernées, ainsi que la formation d'associations plus stables dans certains types d'agrégats comme ceux de la taille des limons fins, méritent d'être vraiment précisées et établies pour définir le comportement de ces contaminants et proposer des voies plus précises et complémentaires de traitement. Ces voies de traitement seront aussi plus faciles à définir en ayant une bonne connaissance de la nature et du rôle des constituants des agrégats considérés

IV.2.2. Comportement des microorganismes dans les sols contaminés par des HAP

Par rapport au peuplement microbien total, le pourcentage de microorganismes dégradant les HAP varie en fonction du sol et en fonction des classes d'agrégats. Pour le sol industriel SP, c'est dans les agrégats de la taille des limons fins que ce pourcentage est le plus important. Après 6 mois d'incubation, la proportion de microorganismes dégradant des HAP est relativement importante dans le sol de Bellefontaine artificiellement contaminé (BF), ce qui suggère, une bonne "adaptation" de la microflore avec la quantité d'HAP apportée (1 ‰ au total).

En effet, l'apport des contaminants de type HAP dans les trois types de sols (BF, RD et BD) entraîne la stimulation et l'accroissement des communautés microbiennes, essentiellement bactériennes, dégradant les HAP comme le PHE, mais aussi l'ANT qui sont les produits utilisés dans les milieux de culture.

Les expériences n'ont pas mis en évidence de toxicité vis-à-vis du peuplement microbien total. Mais de tels effets ont pu se produire juste après l'apport et n'ont pas été observés après 6 mois de contamination. En effet, les communautés microbiennes ou certaines d'entre elles se sont sans doute adaptées et ont été stimulées par l'apport de ces sources de carbone et d'énergie (HAP) et les conditions d'incubation (humidification des sols pour une humidité voisine de la capacité au champ).

Les communautés bactériennes dégradant les 3 HAP choisis dans le milieu de culture (PHE, ANT, FLU) passent de quelques bactéries ou quelques centaines de bactéries par g de sol à environ 10^7 bact./g de sol et montrent ainsi un développement important après plusieurs mois de contamination. Les microflores dégradant ces 3 HAP ou l'un d'entre eux représentent alors 0,07 % à 100 % et plus de la communauté bactérienne correspondant à la microflore totale.

La répartition de la microflore totale est homogène pour l'ensemble des fractions granulométriques ou classes d'agrégats. En revanche, la répartition est différente pour les communautés bactériennes dégradant les HAP. Ces bactéries dégradantes sont relativement plus nombreuses dans les fractions "limons fins" et "argiles" du sol de Bellefontaine (BF) comme elles le sont pour le sol industriel (SP). Mais on trouve dans ce sol BF un nombre important de bactéries dégradantes dans la fraction de la taille des sables qui est constituée de particules plus fines agrégées par des carbonates. Pour l'ensemble des autres sols contaminés artificiellement, les bactéries dégradantes sont relativement plus nombreuses dans la classe

des agrégats de la taille des argiles et/ou des limons fins et des sables, mais jamais dans la classe des limons grossiers.

Le nombre de bactéries croissant en présence de 3 HAP (PHE, ANT, FLU) est le même que pour celles se développant sur le PHE comme seule source de carbone et ceci dans toutes les classes d'agrégats et pour tous les sols sauf pour les agrégats sableux du sol de Bordeaux. Des isolements bactériens ont été effectués sur ce sol et ses différentes fractions d'agrégats (chapitre II) pour tenter de caractériser ou au moins préciser la nature des communautés et populations bactériennes se développant dans ces sols et de souligner d'éventuelles différences ou spécificité de ces milieux.

Aucune corrélation n'a été observée entre le nombre de bactéries et la biodégradation des HAP. Deux hypothèses peuvent être avancées : les dénombrements ne permettent de quantifier qu'une partie des bactéries réellement présentes dans le sol car ils sont basés sur une capacité de croissance sur des milieux plus au moins spécifiques. En outre, aucune activité microbienne spécifique n'a été mesurée et il est vraisemblable que c'est l'activité et non le nombre de microorganismes qui présente un bon paramètre indicateur de la biodégradation des HAP. Toute fois, le nombre des bactéries dégradantes associé aux différentes classes d'agrégats n'apparaît pas ici comme un facteur limitant la biodégradation, comme il a été déjà mentionné par Bosma et al. (1997) car les communautés sont nombreuses.

L'observation en microscopie électronique à transmission de coupes ultrafines des sols pollués expérimentalement et du sol industriel montre de nombreuses bactéries viables. Ces bactéries dans les sols contaminés, tout comme dans le sol industriel, sont réparties sous forme de colonies et micro-colonies enrobées par une matrice polysaccharidique (ou biofilm) qui probablement les protège et/ou leur facilite la dégradation des HAP. En effet de nombreuses bactéries produisent des biosurfactants (polymères bactériens) pour augmenter la solubilité des HAP (Déziel et al., 1996). Ces micro-colonies paraissent piégées au sein de composés organiques dans les agrégats de la taille des limons fins des deux sols (industriel et contaminé). Ceci pourrait expliquer la présence simultanée de bactéries et de HAP et la faible voir l'absence de biodégradation dans certains cas. Dans cette situation, une action physique et/ou physico-chimique améliorerait l'accessibilité et la biodégradation des HAP (chapitre II).

En outre, la localisation de bactéries dans des agrégats relativement stables, comme ceux observés dans les limons fins, peut être la cause de la sous-estimation des peuplements bactériens et de la limitation de leur activité.

IV.2.3. Effet de la structure du sol et de la teneur en MO sur le devenir des HAP

Les HAP ont une forte tendance de s'associer aux matériaux organiques du sol (Xing, 1997; Raber et al., 1998), c'est pour cette raison, que nous avons utilisé le sol de Riedhof (RD) qui présente des propriétés intéressantes pour l'étude du devenir des HAP. En effet, dans ce sol 85 % de la masse totale sont représentés par deux classes d'agrégats de tailles différentes (2000-50 μm et 20-2 μm) mais avec des teneurs identiques en C organique (22 et 19 %). Grâce à la technique de fractionnement granulométrique utilisée qui permet de préserver les agrégats, il était possible de démontrer que les polluants récalcitrants s'accumulaient préférentiellement dans les agrégats les plus fins et ceci indépendamment de la teneur en C organique.

L'amendement et l'incubation du sol RD pendant 2 ans en microcosme a montré que les HAP à faible poids moléculaire (< 203) et le B(a)ANT disparaissent complètement durant la première année et que leur faible concentration demeure la même ou voisine après la 2^{ème} année d'incubation du sol. Ceci indique que cette portion de HAP n'est pas bio-disponible même si elle est extractible. Les plus grandes quantités de ces molécules sont extraites des fractions d'agrégats les plus fins (LF et A) à deux stades de prélèvement du sol (1 et 2 ans). Les analyses chimiques ont également montrés que la vitesse de dissipation des HAP à 4 et 5 cycles est plus rapide que celles données par les temps de demie- vie estimés et reportés dans la littérature ($t_{1/2} > 200$ jours) par Sims et al. (1988). Ceci indique une forte bio-disponibilité et un faible degrés d'adsorption irréversible de ces composés aux constituants du sol sous les conditions expérimentales adoptées pour cette étude. Les concentrations de certains HAP à 5 et 6 cycles diminuent progressivement durant les deux années d'incubations et atteignent des valeurs proches de zéro dans le cas du B(k)FLT et dB(a,h)ANT (pour dB(a,h)ANT seulement

dans le sol sans fractionnement). Ces tendances ont été observées dans le sol non fractionné et pour les concentrations cumulées de l'ensemble des HAP dans les quatre classes d'agrégats.

Les analyses de la concentration des molécules à 5 et 6 cycles dans chaque classe d'agrégat, n'indiquent aucun changement important de la teneur de ces molécules dans la fraction 2000-50 µm durant les deux années. En revanche dans les fractions fines, un enrichissement de ces molécules a été détecté après 6 mois suivi d'une diminution de leur concentration (dans certains cas les concentrations ont été au dessus de celles initialement ajoutées au sol). Ceci reflète une association préférentiel des HAP avec les fractions fines après la contamination du sol et son incubation. L'association des HAP avec les particules du sol les plus fines a été déjà démontré (Kukkonen et Landrum, 1996; Müller et al., 2000), mais les analyses ont été effectuées sur les particules primaires constituant l'agrégat et où les teneurs en C organique diminuent avec l'augmentation de la taille des particules. Les résultats obtenus après désagrégation, qui a permis une dispersion du C piégé au sein des agrégats ne montrent ni la localisation propre des HAP (le sol a subi un fractionnement chimique) ni la localisation préférentielle des processus de dégradation ou d'enrichissement des HAP.

Il est fort possible que l'accumulation et la dégradation préférentiel des HAP dans les agrégats les plus fins soient dus à des différences de la qualité des matières organiques entre les différentes classes d'agrégats. En effet, une forte proportion des groupements aromatiques humifiés, qui ont de fortes affinités avec les HAP, peut être localisé dans les limons fins et les argiles plutôt que les fractions grossières (Christensen, 1992; Guggenberger et al., 1995). Ainsi les fractions fines ont tendance à piéger les polluants et à les protéger physiquement en limitant l'accès aux microorganismes à l'intérieur des agrégats.

La biodégradation d'un mélange de composés chimiques tels les HAP est aussi très complexe en raison des interactions entre les constituants du sol et les métabolites provenant des molécules mères qui peuvent entraîner soit une augmentation de la dégradation par co-métabolisme soit une inhibition de la dégradation d'un HAP en raison de l'inhibition par d'autres HAP ou par leurs produits d'oxydation (Bouchez *et al.*, 1995; Kelley et Cerniglia, 1995).

V. Conclusion

L'hétérogénéité spatiale des sols tant pour l'organisation et la réactivité des constituants que pour la répartition des polluants organiques et des microorganismes contribue aux difficultés rencontrées pour étudier le devenir et de la dégradation des polluants dans cet environnement. Cette hétérogénéité est bien précisée dans cette étude et apparaît dans cette étude dans la distribution des HAP et des communautés bactériennes capables de les dégrader. Ils sont localisés différenciellement au sein d'agrégats de différentes tailles. Les résultats montrent que sous des conditions réelles de sol avec des communautés bactériennes autochtones, la biodégradation d'un mélange de molécules de HAP dans le sol est contrôlée par la nature de ces polluants, mais aussi par certains paramètres du sol en particulier, la nature des particules du sol et des agrégats avec lesquels sont associés les HAP. Les agrégats de petites tailles, les matières organiques jouent un rôle fondamental.

La distribution hétérogène des HAP au sein des agrégats du sol souligne aussi le rôle majeur de la structure du sol et de la nature des constituants (MO et minéraux) des agrégats dans l'immobilisation et la stabilisation des polluants tel les HAP. Pour un mélange complexe de molécules de HAP, la biodégradation apparaît rapide uniquement pour les molécules à 3 ou 4 noyaux aromatiques qui semblent être plus facilement accessibles aux bactéries. Les résultats ont également montré que la biodégradation et donc la bio-remédiation devient plus difficile avec le vieillissement de la contamination et particulièrement pour les HAP résiduels qui « se stabilisent » au sein de la structure du sol. Il semblerait que, la biodégradation des HAP, dans un temps de contamination assez court, rentre en compétition avec les processus de migration et de stabilisation des HAP dans des compartiments du sol non accessibles. Ce volet de recherche concernant la définition des mécanismes responsables de la stabilisation des HAP et la variabilité de leur distribution entre différents agrégats du sol devrait être étudié d'abord sur des modèles moins complexes en distinguant chaque paramètre et les suivant de façon plus précise. Cette étude est abordée dans le second chapitre.

Chapitre II :
Etude des phénomènes de stabilisation des
hydrocarbures polyaromatiques dans les
sols et compétition avec les bactéries
dégradantes

Résumé

Après la mise en évidence du rôle de certains paramètres du sol (texture, structure, MO...) sur la dissipation, la localisation d'un mélange de 8 molécules de HAP et des bactéries dégradantes dans des sols pollués incubés en microcosme sous des conditions d'atténuation naturelle, cette deuxième partie de l'étude consiste à analyser :

- 1) les paramètres microbiens : nature et structure des communautés microbiennes dégradantes, compétitivité des bactéries dégradantes inoculées ;
- 2) les paramètres physico-chimiques : dispersion des agrégats, quantité et nature des nutriments organiques et inorganiques, température, présence de tensioactifs, stabilisation et disponibilité des HAP.

Pour étudier les mécanismes qui contrôlent la biodégradation et la stabilisation-séquestration des HAP dans les sols, cette étude s'est réalisée avec des modèles expérimentaux simples, en suivant la dégradation d'un seul HAP, le phénanthrène, fréquemment rencontré dans les sols pollués. Ces expériences ont été conduites dans deux types de sols (sableux acide: Bordeaux et argileux organique : Rhiedof) contaminés artificiellement et présentant des caractéristiques différentes.

La première étape de cette étude a porté sur l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes dégradantes. La diversité génétique et fonctionnel des populations bactériennes dégradantes les plus dominantes a été comparée entre les agrégats « grossiers » (sables et limons grossiers) et les agrégats « fins » (limons fins et argiles) du sol de Bordeaux contaminé artificiellement. Les bactéries dominantes sont Gram- et appartiennent essentiellement à 4 genres (*Burkholderia*, *Ralstonia*, *Stenophomonas* et *Herbaspirillum*) Dans ce sol, des interactions entre les agrégats, de taille (2000-50 μm et < 2 μm) et de teneur en C organique (0,3 et 27 % respectivement, dans les deux classes) différentes, le phénanthrène et les bactéries (autochtones et inoculées) ont été étudiés. Les incubations en batch de ces agrégats de la taille des sables et des argiles contaminés avec de forte concentration en phénanthrène en présence d'une bactérie dégradante préalablement isolée de ce sol (*Burkholderia sp.* NAH1) entraînent une solubilisation et une biodégradation simultanées du phénanthrène. Les différences dans la quantité du phénanthrène en phase aqueuse entre les deux fractions

d'agrégats (élevée dans les sables et faibles dans les argiles) peuvent être dues à la différence dans la capacité d'adsorption du PHE par les agrégats argileux et sableux.

La deuxième étape de ce travail visait à définir le comportement et la bio-disponibilité du phénanthrène (marqué au ^{14}C) dans le sol de Bordeaux en comparaison avec un autre sol riche en matière organique ; sol de Riedhof et ceci en présence et en absence de la bactérie dégradante *Burkholderia sp.* NAH1. Aucune minéralisation du phénanthrène n'a été détectée dans le sol sableux (Bordeaux) en revanche, l'inoculation bactérienne, 50 jours après vieillissement de la contamination, en combinaison avec l'apport de phosphore et d'azote stimulent la minéralisation du phénanthrène dans le sol tourbeux (Riedhof). Ceci conduit à la diminution des résidus liés plutôt associés à la fraction humine que ceux liés aux acides humiques et fulviques. Dans le sol de Bordeaux, en absence d'activité bactérienne la rétention du phénanthrène est plus importante dans ces mêmes fractions et en particulier celle liée à l'humine.

Ce phénomène (formation de résidus liés avec les fractions de la MO) est moins prononcé, quand l'inoculation bactérienne suit directement la contamination des sols, la biodégradation étant de suite importante. La bactérie inoculée est maintenue dans les deux sols à des densités très élevées en présence comme en absence de compétiteurs microbiens. L'apport de surfactant (Triton X-100) semble modifier le métabolisme du phénanthrène par la bactérie inoculée en milieu de culture minéral mais pas significativement dans le sol.

I. Introduction

Le sol constitue un environnement favorable pour la dégradation des polluants organiques. Il renferme de l'eau, des nutriments minéraux, de l'oxygène et possède une grande surface spécifique qui permet un contact et des échanges importants entre les polluants et les organismes dégradeurs. C'est aussi un réservoir d'organismes et notamment de micro-organismes, qui participent activement à la dégradation des matières et contaminants organiques. En effet tous les sols renferment une grande diversité de micro-organismes, d'un point de vue taxonomique mais aussi fonctionnel, dont une grande proportion est capable d'utiliser les polluants organiques comme substrat de croissance (Hanson et al., 1999). Les sols qui n'ont jamais été exposés à des pollutions organiques contiennent en général, au moins en faibles quantités, des microorganismes indigènes capables de dégrader des polluants récalcitrants. De plus, la communauté microbienne du sol semble présenter de fortes capacités de résistance et/ou d'adaptation : elle supporte souvent l'arrivée de polluants toxiques sans que l'on puisse mesurer de réduction dans l'ensemble des fonctions métaboliques (Giller et al., 1998 ; Thompson et al., 1999), même si la composition des espèces peut être modifiée (Frostegard et al., 1993).

I.1. Bioaccessibilité des hydrocarbures polyaromatiques

Une grande variété de bactéries et de champignons sont capables de métaboliser les HAP. La principale voie de dégradation bactérienne passe par l'oxydation d'un cycle benzénique par une dioxygénase qui conduit à la formation d'un cis-dihydrodiol. La dégradation se poursuit progressivement par ouverture du cycle, production de composés aliphatiques jusqu'à la minéralisation complète de la molécule. Les bactéries dégradant les HAP sont essentiellement des *Pseudomonas cepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Sphingomonas paucimobilis* (Kästner et al., 1994; Juhasz et al., 1997; Boonchan et al., 1998). Ces bactéries possèdent des enveloppes externes particulières contenant des lipopolysaccharides. Certaines de ces souches produisent des biosurfactants qui améliorent la bio-accessibilité des HAP. Ces derniers peuvent agir en formant un substrat micellisé directement accessible, en modifiant l'hydrophobicité cellulaire et donc les possibilités d'accessibilité directe ou en permettant la colonisation du substrat par la formation d'un biofilm. Par ailleurs, de nombreux travaux ont montré que les contaminants adsorbés aux constituants du sol ne sont pas directement disponibles pour la dégradation par les micro-organismes (Weissenfels et al., 1992) et que la vitesse de désorption des HAP de la

matière organique contrôle la vitesse de leur biodégradation (Chung et al., 1993; Pignatello et Xing, 1996). Bien qu'il y ait des évidences de la capacité de certains micro-organismes à dégrader les contaminants adsorbés (Tang et al., 1998; Friedrich et al., 2000), la fraction solubilisée dans l'eau du sol reste la plus bio-disponible. Les HAP étant peu solubles, leur dégradation sera régulée par leur transfert vers la phase soluble (Shuttleworth et Cerniglia, 1995).

Pour favoriser et obtenir une dégradation totale des HAP, un contact efficace entre les microorganismes actifs et les polluants paraît nécessaire. Cependant, la majorité de ces polluants organiques interagissent avec les constituants du sol et ces interactions peuvent améliorer la biodégradation ou la limiter (Chiou et al., 1985; Weissenfels et al., 1992). Des travaux ont montré que le transfert lent des HAP à l'intérieur des agrégats est contrôlé par les interactions entre les constituants du sol et ces polluants et ceci en utilisant des agrégats synthétiques (Scow et Alexander, 1992) ou des billes poreuses (Harms et Zehnder, 1995). D'autres expériences considérant l'influence de la taille des agrégats ont suggéré que la surface spécifique disponible des agrégats peut être le facteur majeur qui détermine la vitesse de biodégradation (Stella et al., 1990).

1.2. Piégeage physique des HAP au sein des agrégats

Le phénomène de diffusion des polluants dans l'eau immobile des microagrégats peut conduire au piégeage physique de ces polluants hydrophobes au sein des micro- et nanopores des microagrégats du sol (Ball et Roberts, 1991). Selon certains auteurs, la diffusion moléculaire au sein des micro- et nano-pores des complexes argilo-humiques pourrait cependant conduire à une séquestration réelle des molécules organiques hydrophobes dans les matrices sols. La séquestration est définie par Hatzinger et Alexander (1995) comme le piégeage physique des polluants organiques dans la microstructure du sol. Les molécules ayant pénétré dans la microstructure y seraient piégées par exemple par bouchage des pores du à l'adsorption des polluants, et seraient incapables de repasser en solution libre du sol. Cette hypothèse permet d'expliquer des résultats expérimentaux sur la bio-disponibilité des polluants organiques dans les sols et les sédiments (White et al., 1997 ; Chung et Alexander, 1998 ; Nam et Alexander, 1998, White et Pignatello, 1999 ; White et al, 1999). Les travaux récents sur l'adsorption de polluants organiques hydrophobes sur des silica-gels poreux et non poreux ont cependant mis en évidence que la diffusion du soluté jusqu'au contact des surfaces

minérales internes ne permettait pas d'expliquer l'irréversibilité partielle de l'adsorption sur des matrices purement minérales (Huang et al., 1996). D'après les travaux de Farrell et al. (1999), il pourrait s'agir plutôt d'un mécanisme de blocage des micropores par précipitation de minéraux en condition saturée empêchant la désorption des polluants.

La nature de la matière organique peut également conduire à des interactions d'intensités différentes en fonction de ses caractéristiques hydrophobes/hydrophiles ou de son degré d'aromaticité (Chin et al., 1997). Etant donnée la nature hydrophobe de polluants organiques tels que les HAP, les interactions les plus importantes entre ces polluants et les constituants de la matière organique du sol sont des interactions de type hydrophobe (Dec et Bollag, 1997 ; Laor et al., 1998).

La séquestration des HAP dans les sols définie uniquement comme un piégeage physique des polluants organiques doit être distingué de la formation de « résidus liés ». Des travaux ont été menés sur le vieillissement des polluants organiques en condition abiotique afin d'évaluer leur séquestration (par des extraction successives avec un solvant organique) et leur bio-disponibilité vis-à-vis des microorganismes (test de minéralisation aérobie en milieu nutritif). Les résultats obtenus mettent en évidence d'une part qu'il n'y a pas formation de résidus liés au cours de la phase de vieillissement en condition abiotique et, d'autre part, que la bio-disponibilité des polluants organiques diminue avec la durée de vieillissement (Bayard, 1997 ; Mahjoub, 1999 ; Bayard et al., 2000).

1.3. Stabilisation des HAP dans les sols

L'adsorption des polluants organiques par les constituants des sols est considérée comme la première étape dans les processus de leur stabilisation. Elle va réguler le partage du polluant entre les phases liquide et solide. La part du polluant dans la solution du sol est la part considérée « disponible » : disponible pour contribuer aux phénomènes de contamination, mais aussi disponible pour être dégradé par la microflore du sol. L'adsorption va donc réguler la disponibilité des polluants. Par ailleurs, l'état des polluants adsorbés sur la phase solide du sol va évoluer vers l'établissement des interactions rendant ces polluants retenus de moins en moins disponibles. Ceci peut être considéré comme un processus de stabilisation du polluant, culminant avec la formation de résidus non ou difficilement disponibles. L'évaluation de la proportion de ces résidus se fait à l'aide des techniques d'extraction, en distinguant les composés extractibles dans les solvants habituels (méthanol, chloroforme ...) des composés

non extractibles. Ce processus de stabilisation contribue aux processus d'« atténuation naturelle ».

L'intensité de la formation des résidus non extractibles ou résidus liés dépend de la nature du polluant organique et des constituants du sol. Différentes hypothèses sont émises pour expliquer l'origine de la formation de résidus non-extractibles : formation de liaisons covalentes, en particulier avec les constituants organiques du sol, blocage dans la microporosité des structures colloïdales organiques (Ortega-Calvo et Saiz-Jimenez, 1998; Richnow et al., 1998).

L'extraction des HAP dans les solvants organiques est un bon indicateur de la fraction potentiellement bio-disponible pour la dégradation (Breedveld et Karlsen, 2000). Cette fraction bio-disponible diminue avec le temps de résidence des HAP dans les sols, en raison du développement d'interactions entre les molécules de HAP et les constituants des sols. On parle de vieillissement des HAP (Hartzinger et Alexander, 1995). Cette fraction non-extractible peut également évoluer avec le temps; par exemple la minéralisation de la matière organique du sol peut provoquer la libération des polluants préalablement non-extractibles. Seule l'utilisation de molécules marquées isotopiquement (généralement marquées ^{14}C , mais aussi plus récemment ^{13}C) permet de faire la part entre toutes les voies de dissipation d'un polluant organique.

1.4. Objectif de l'étude

L'objectif de cette partie de l'étude est d'apporter des éléments permettant d'évaluer les processus de stabilisation des HAP dans les sols. Il s'agira de : (i) définir la part de la minéralisation microbienne et de la formation de résidus non-extractibles des HAP dans les phénomènes de dissipation des polluants dans le sol; (ii) relier le devenir des polluants organiques à la nature des microflores actives (autochtones ou inoculés) et à la teneur et la nature de la matière organique en fonction du type de sol; (iii) déterminer certains facteurs limitant la bio-disponibilité des HAP vis-à-vis d'une bactérie dégradante inoculée et enfin (iv) améliorer la bio-dégradation des HAP par la stimulation de l'activité microbienne après apport de nutriments inorganiques ou ajout de surfactant. Pour cette étude, le phénanthrène, un hydrocarbure polyaromatique souvent présent dans les sols contaminés a été utilisé comme modèle.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Communautés bactériennes dégradantes

Les expériences ont été conduites en utilisant l'ensemble des communautés bactériennes des sols étudiées ou des bactéries isolées pour leur capacité à dégrader des HAP. Des témoins abiotiques ont permis de distinguer les processus biologiques et biochimiques des processus abiotiques chimiques ou physico-chimiques.

II.1.1. Isolement et capacité dégradante des bactéries

a) Isolement bactérien

Des isollements de bactéries ont été effectués à partir de suspensions-dilutions d'échantillons de sol de bordeaux (BD) et de ses différentes fractions d'agrégats (S, LG, LF et A), obtenues par fractionnement à l'eau (décrit dans le chapitre I). Les bactéries ont été isolées après 3 semaines d'incubation des suspensions-dilutions dans des microplaques contenant le milieu minéral et les HAP. Les isolats bactériens ont été repiqués en boîtes de Pétri sur milieu NB solidifié (Nutrient Broth, Difco, à 1 g l⁻¹, solidifié avec 15 g l⁻¹ de gélose) plusieurs fois afin de les purifier. Les colonies purifiées ont été ensuite repiquées sur milieu minéral (Bushnell-Hass) contenant soit le phénanthrène seul ou en mélange avec l'anthracène et le fluorène. Ceci a permis de sélectionner les souches bactériennes les plus performantes ayant et pouvant maintenir leur potentiel de dégradation même après croissance sur un substrat facilement dégradable (milieu NB).

b) Capacité à dégrader des contaminants organiques

Les isolats bactériens sélectionnés à partir des différents agrégats de sol contaminé ont été testés pour leur capacité à dégrader le phénanthrène (500 µg/ml) et le fluorène (50 µg/ml) en présence d'autres sources de carbone (glucose: 10 mg/ml, succinate 10 mg/ml et l'acide salicylique: 1 mg/ml). Les microplaques ont été utilisées pour étudier la croissance des isolats bactériens dans différents milieux liquides en présence de ces HAP et de différentes sources de carbone. Les inoculum bactériens (10⁶ bact/ml) ont été préparés dans une solution de NaCl (0.85%) après 24 h de croissance dans le milieu Luria Broth (LB). Après 1 à 2 semaines d'incubation la mesure de la densité optique à 405-620 nm révèle la croissance bactérienne et la formation des métabolites de dégradation du phénanthrène et du fluorène correspondant respectivement au 1-hydroxy-2-naphthoïc et au 9-hydroxy-9-fluorenone (Boldrin et al., 1993).

II.1.2. Caractérisation morphologique des isolats bactériens

La morphologie et la taille des cellules bactériennes ont été déterminées à l'aide de la microscopie électronique à transmission. Après 24 h de croissance sur le milieu LB, les cultures bactériennes de différentes souches ont été centrifugées, lavées puis mis en suspension dans un tampon d'acétate d'ammonium (10 mM). La mise en évidence des flagelles est réalisée grâce à un marquage avec l'acide phosphotungstic (2%). Les cellules bactériennes ainsi préparées sont ensuite couvertes d'une couche ultrafine de carbone (Formvar/carbon 300 mesh, Cu) puis examinées à l'aide d'un microscope électronique à transmission (Zeiss EM9 S2).

II.1.3. Identification des souches bactériennes isolées

Les clones représentatifs des populations dominantes sélectionnés selon les critères décrits précédemment ont été par la suite caractérisés par des tests biochimiques en utilisant le système d'identification Biolog. Les cultures bactériennes de différents isolats ont été mis en suspension dans 5 ml de NaCl 0,85% puis ajustées à une absorbance de 0,25 à 550 nm pour les bactéries Gram négatives et de 0,36 pour les bactéries Gram positives, dans un volume final de 20 ml. Un volume de 150 µL de cette suspension est distribué dans chacun des 96 puits de la plaque Biolog et mis en incubation pendant 24 h à 30°C. L'identification des bactéries est basée sur l'utilisation des sources de carbone présentes dans les différents puits par rapport à une base de données Biolog. L'activité métabolique pour chaque substrat est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à 590 nm.

L'identification phénotypique des souches bactériennes a été complétée par une caractérisation moléculaire du gène codant pour l'ARNr 16S. Ce gène a été amplifié par PCR, puis séquencé à l'aide du Kit ABI Prism et d'un séquenceur automatique Perkin Elmer. Les séquences obtenues ont été alignées avec des séquences d'autres espèces bactériennes. A partir d'une analyse comparative des séquences de l'ADNr 16S (Basic Local Alignment Search Tool in GenBank), le pourcentage d'homologie a été calculé au sein d'une même espèce et entre les différentes espèces.

II.1.4. Choix et caractérisation d'une bactérie dégradante

La souche bactérienne utilisée est une *Burkholderia sp.* NAH1, isolée pour sa forte capacité à dégrader les HAP et plus particulièrement le phénanthrène. Le choix de cette bactérie pour cette étude a été aussi déterminé par l'existence d'un sérum spécifique

permettant de la reconnaître et de la quantifier directement dans le sol.

Préparation de l'inoculum bactérien

La souche NAH1 conservée dans du glycérol à -80°C a été mise en culture dans un milieu nutritif (Luria Broth, Difco) pendant 24 h à 28°C . Après croissance dans le milieu LB, la culture bactérienne est centrifugée à 10000 tr/min pendant 10 min, lavée et mise en suspension dans l'eau stérile puis inoculée à des concentrations données en fonction du traitement étudié.

Différentes modalités d'incubation des sols et des agrégats en présence et en absence de cette souche bactérienne ont été effectuées.

1) Dégradation du phénanthrène par la souche NAH1

Une culture en batch de la souche NAH1 a été réalisée avec le phénanthrène en suspension dans le milieu minéral (Bushnell-Hass) à une concentration de 0,016% (conc. > solubilité). Les flacons de culture ont été incubés à l'obscurité à une température de 28°C sous agitation (200 rpm).

2) Minéralisation du phénanthrène par la souche NAH1

Des cultures en batch de la souche *Burkholderia sp.* NAH1 ont été menées en présence de ^{14}C -phénanthrène dans des flacons serum de 250 ml stériles et hermétiquement fermés. Ces flacons contenant 20 ml de milieu minéral (Bushnell Hass, Difco) ont été incubées dans un bain thermostaté à 28°C . Le phénanthrène a été ajouté dans une solution méthanolique contenant 10^6 dpm (1,57 μg) du phénanthrène marqué et 5 mg de phénanthrène non marqué. La souche bactérienne cultivée pendant 24 h dans le milieu LB a été mise en suspension dans de l'eau stérile après centrifugation et lavage. 1 ml de la suspension bactérienne est inoculé dans les flacons de culture pour avoir une concentration de 10^7 bactérie/ml. La minéralisation du ^{14}C -phénanthrène par la souche NAH1 a été étudiée en présence du Triton x 100 (0,15%) et de la solution minérale (N/P : 2/1).

Le ^{14}C - CO_2 issu de la minéralisation du ^{14}C -phénanthrène est piégé dans 10 ml de soude (0,4 N) au cours de l'incubation, puis déterminé par comptage en scintillation liquide d'une aliquote de 1 ml de soude additionnée de 5 ml de liquide scintillant (Ultimagold XR, Packard). La radioactivité est comptée à l'aide d'un compteur Tri Carb (Packard) avec mesure du bruit de fond et correction de quenching par standardisation externe.

II.2. Biodégradation des HAP

Afin de mettre en évidence une éventuelle protection physique des HAP au sein des agrégats du sol contaminé, plusieurs démarches expérimentales ont été adoptées dans lesquelles le phénanthrène a été choisi comme composé modèle d'étude ainsi qu'une bactérie dégradante préalablement isolée du sol sableux (BD) contaminé par les HAP (cf. § I).

II.2.1. Sols

Les expériences ont été réalisées sur le sol de Bordeaux et le sol de Riedhof (décrits dans le chapitre I) dont les caractéristiques physico-chimiques et les teneurs en carbone organique sont différentes.

II.2.2. Incubations en batch des agrégats contaminés

La biodégradation du phénanthrène a été mesurée au sein des agrégats de la taille des sables (50-2000 μ m) et des argiles (0-2 μ m) du sol de Bordeaux. Ces agrégats ont été contaminés par le phénanthrène à raison de 4 mg/g de sol. Les incubations ont été réalisées à l'obscurité à une température de 28°C à l'aide de flacons sérums hermétiques dans lesquels sont introduits 1,5 g d'échantillon contaminé en immersion dans 25 ml d'eau distillée. Ces suspensions d'agrégats de sol ont été mis sous agitation (200 rpm) et ont été régulièrement aérés afin de renouveler l'oxygène à l'intérieur des batchs. Les traitements inoculés par la bactérie NAH1 reçoivent 4×10^7 bactérie/ml par flacon. A l'issue de 30 jours d'incubation les communautés bactériennes totales et dégradant le phénanthrène ont été dénombrées. Un dosage du phénanthrène soluble a été effectué en fin d'incubation. Les métabolites d'oxydation du phénanthrène ont été identifiés par séparation chromatographique et spectrométrie de masse.

II.3. Incubations des sols en présence d'HAP marqué au ^{14}C

Démarche adoptée : deux types d'expérience sur les sols de Bordeaux et de Riedhof ont été effectuées afin d'observer les mécanismes de stabilisation-biodégradation et l'effet de l'inoculation d'une bactérie dégradante sur la dissipation du phénanthrène :

- la première série d'incubation consistait à apporter des nutriments et à inoculer une bactérie dégradante après une période de vieillissement de la contamination.
- la deuxième série d'incubation correspondait à l'inoculation bactérienne directement après contamination des sols avec ou sans ajout de surfactant.

II.3.1. Le polluant organique utilisé

Toutes les expériences sont réalisées avec le phénanthrène non marqué et marqué au ^{14}C (Sigma-Aldrich). La concentration du ^{14}C -phénanthrène est ajustée avec la molécule froide non marquée. Le phénanthrène est marqué ^{14}C sur le carbone 9 de la molécule.

II.3.2. Contamination des sols et mise en place des incubations

Les sols ont été contaminés à raison de 10^6 dpm de ^{14}C -phénanthrène et 5 mg de phénanthrène non marqué pour 25 g de sol sec, ce qui correspond à un niveau de contamination de 200 mg/Kg de sol. 10 g de chaque sol ont reçu un volume de solution méthanolique (5 ml) contenant le phénanthrène (^{14}C + froid). Après évaporation du méthanol (1 nuit), 15 g de sol non contaminé ont été mélangé de façon homogène au sol contaminé. L'humidité de chaque échantillon est ensuite ramenée à la capacité au champ. Pour cela des volumes de 2,6 ml et de 20 ml d'eau ont été ajoutés respectivement, dans les échantillons du sol de Bordeaux et de Riedhof. Afin de déterminer l'effet du méthanol apporté avec la solution du ^{14}C -phénanthrène sur l'activité microbienne, des incubations témoins avec du sol non contaminé mais mélangé avec du méthanol sont réalisées pendant la durée de l'expérimentation. L'apport du phénanthrène dans le méthanol ne concerne que les 2/5 du sol placé dans les flacons d'incubation pour éviter les effets (toxicité ou source de carbone) du méthanol.

Une première série d'expérience consistait à pré-incuber pendant 49 jours à 22°C les sols contaminés par le ^{14}C -phénanthrène en présence de la microflore autochtone. Ensuite, la température a été augmentée à 28°C et une solution minérale (KH_2PO_4 : 1g/l, K_2HPO_4 : 1g/l, NH_4NO_3 : 2g/l, KNO_3 : 2g/l; pH 6,5) a été ajoutée (1ml/25g) pour instaurer de meilleurs conditions nutritives de croissance bactérienne. La bactérie dégradante a été inoculée sous les mêmes conditions dans les échantillons concernant les traitements biotique : 1 ml d'une suspension bactérienne ($1,2 \cdot 10^8$ bact./ml) est ajouté à 25 g de sol pour tous les traitements inoculés. La bactérie a été mise en suspension dans la solution minérale (N/P : 2/1) uniquement pour les traitements avec apport de nutriments minéraux. L'incubation a été ensuite maintenue pendant 50 jours.

Dans la deuxième série d'expérience, la souche bactérienne a été inoculée directement après contamination des sols en présence (traitement biotique) et en absence (traitement abiotique)

de la microflore autochtone. L'effet d'un surfactant sur la biodisponibilité du phénanthrène vis à vis de l'inoculum bactérien a été testé en utilisant le Triton X-100 à 0,15%. Toutes les expérimentations ont été réalisées avec trois répétitions par traitement.

II.3.3 Minéralisation du carbone organique total

Le CO₂ issu de la minéralisation du carbone organique total au cours des incubations est dosé par un auto analyseur Irga (Infra Red Gaz Analyser Irga). La quantité de CO₂ totale dégagée dans l'atmosphère des flacons d'incubations est convertie en mg de C-CO₂ en se rapportant à la courbe d'étalonnage établie à chaque mesure. Les résultats sont exprimés par un taux de minéralisation défini par rapport au C total du sol c'est à dire par un pourcentage du C total minéralisé ou par la quantité de C minéralisé par g de sol ou g de carbone du sol (mg de CO₂/C organique total du sol).

II.3.4. Devenir du ¹⁴C-phénanthrène dans le sol

a) Fraction minéralisée du ¹⁴C-phénanthrène

La fraction minéralisée du ¹⁴C-CO₂ piégée dans la soude est déterminée au cours de l'incubation des échantillons du sol selon la méthode décrite précédemment (cf. § II.3.2.).

b) Fraction extractible du ¹⁴C-phénanthrène

L'échantillon de sol (3 g) contenu dans une cartouche de cellulose subit plusieurs cycles d'extraction par du chloroforme par la méthode du soxhlet, système de reflux, optimisé pour 4 heures (Binet et al., 2000). Trois extractions sont réalisées pour chaque échantillon puis deux extractions successives sont effectuées pour vérifier que toute la fraction extractible est récupérée. L'extrait récupéré dans 220 ml de chloroforme est concentré à l'évaporateur rotatif (Rotavapor, Büchi) avant l'analyse de la radioactivité. La radioactivité extractible est analysée sur 1 ml de l'extrait au chloroforme mélangé à un liquide scintillant et dosée par comptage en scintillation liquide.

c) Fraction non extractible "résidus liés" du ¹⁴C-phénanthrène

La teneur en radioactivité des échantillons de sol avant et après extraction au chloroforme puis au pyrophosphate-soude est mesurée, sur une aliquote d'environ 300 mg

mélangé avec une quantité équivalente de cellulose, par combustion à l'aide d'un compteur Oxidiser 307 Packard. Le $^{14}\text{CO}_2$ produit par combustion sous courant d'oxygène est récupéré dans un mélange d'une base organique (Carbosorb) et d'un liquide scintillant (Permafluor). La radioactivité est comptée par scintillation en milieu liquide. Deux répétitions sont réalisées pour chaque échantillon. Ces analyses ont été effectuées à L'ENSAIA (en collaboration avec le professeur M. Schiavon).

d) Mesure de la rétention du ^{14}C -phénanthrène aux constituants du sol

Un fractionnement humique de la matière organique est réalisé sur tous les échantillons de sol après extraction au chloroforme. Les fractions humiques et fulviques sont obtenues par extraction dans un solvant alcalin : NaOH (0,1N) et $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (1%) fraîchement préparé (Andreux et Munier-Lamy, 1994). 30 ml sont ajoutés à 3 g de sol sec (séché à l'air), dans des flacons à centrifuger de 50 ml pour chaque extraction. Deux répétitions sont réalisées. Une agitation par retournement est réalisée pendant 2 heures. Le pH d'extraction est de 10. La fraction résiduelle ou fraction humine du sol récupérée avec le culot de centrifugation est séchée à 35°C et conservée pour l'analyse. Le surnageant contenant les composés alcalino-solubles (acides humiques et fulviques) est ramené à un pH 1,6 à l'aide de HCl (3 N). Les tubes sont laissés à 4°C pendant 24 h, temps au cours duquel les acides humiques flocculent. Après centrifugation à 18000 tr/min pendant 20 min, le surnageant contenant la fraction fulvique est dosé après mélange à un liquide scintillant par comptage en scintillation liquide. L'analyse de la radioactivité par combustion n'a été effectuée que sur la fraction résiduelle correspondant à l'humine.

II.3.5. Dénombrement des communautés bactériennes

a) Microflore totale et dégradante

Chaque échantillon de sol (5 g) est mis dans un volume de 100 ml d'eau stérile puis agité avec des billes en verre pendant 1 heure. Des suspensions dilutions de chaque échantillon après agitation sont effectuées dans une solution de NaCl (0,85%). La microflore dégradant le phénanthrène a été dénombrée en plaques de microtitration dans un milieu minéral, en présence du phénanthrène, selon la méthode NPP. La méthode NPP a été

également utilisée pour le dénombrement de la microflore totale en utilisant un milieu nutritif (Nutrient Broth, Difco) à 1g/l.

b) Souche bactérienne inoculée

La reconnaissance et le dénombrement de *Burkholderia sp.* NAH1 sont réalisés à l'aide de la méthode ELISA (Enzyme-Linked-Immuno Sorbent-Assay) (Dziurla et al., 1998). La réaction est réalisée en 1 jour selon les étapes suivantes : 100 µl d'une suspension de bactérie dégradante correspondant à chaque échantillon de sol sont prélevés après 3 semaines d'incubation des microplaques contenant du phénanthrène, puis déposés dans un puit de la microplaque ELISA. Des suspensions-dilutions de la souche NAH1 ont été utilisées comme référence. Après une nuit à 40°C, les puits sont lavés par 200 µl de milieu TBS-Tween 0,05% (trois lavages au total). La saturation des sites non spécifiques se réalise par 100 µl d'une solution à 1% (p/v) de BSA dans le tampon TBS (NaCl: 8g/l; Tris base: 0,6g/l; HCl 1M: 3,8 ml; pH 7,6). Cette réaction se déroule pendant 1 heure à 37°C et sous agitation. Après une étape de lavage (trois lavages dans 200 µl de tampon TBS-Tween 20) 100 µl d'antisérum dilué au $2/10^3$ dans le tampon TBS-Tween-BSA 1%, sont introduits dans chaque puit. La microplaque est incubée 1h à 37°C, sous agitation. Après une étape de lavage, pour éliminer les anticorps non fixés, 100 µl d'anticorps IgG de lapin dilué au $2/10^4$ dans le tampon TBS-Tween-BSA sont ajoutés dans chaque puit. Les plaques sont incubées 1 h à 37°C sous agitation. Après deux lavages par le tampon TBS-Tween, suivi d'un lavage par le tampon diéthanolamine, les complexes antigène-anticorps sont révélés par la réaction enzymatique de la phosphatase alcaline avec 100 µl de para-nitrophényl phosphate (1mg/l). Après 30 min d'incubation à l'obscurité à température ambiante et sous agitation, la réaction est quantifiée par une mesure de la densité optique à 405-620 nm.

Analyses statistiques : Le test ANOVA de Friedman a été réalisé sur les dénombrements bactériens et sur les teneurs en ^{14}C -phénanthrène.

III. Résultats

Les résultats présentés dans le chapitre I montraient des différences quantitatives, significatives, dans la répartition des communautés bactériennes dégradantes et des HAP entre les différentes tailles d'agrégats. Il semblait particulièrement intéressant de préciser la nature de ces bactéries dans les différents agrégats.

III.1. Nature et caractérisation des populations dégradantes dans un sol contaminé par les HAP

Cette étude a été effectuée dans le but d'analyser les différences relatives dans la composition de la microflore bactérienne dégradante et dominante entre les agrégats de grandes tailles (sables et limons grossiers) et les agrégats les plus fins (limons fins et argiles). Ceci afin de déterminer si la concentration la plus élevée des HAP dans les classes d'agrégats les plus fins favorise l'apparition d'une microflore spécifique ayant de fort potentiel de dégradation de ces HAP.

III.1.1 Isolement, identification et caractérisation des bactéries dégradantes

L'isolement, la purification et l'identification de souches bactériennes ont été effectués à partir des différentes fractions du sol de Bordeaux contaminé par un mélange de 8 molécules de HAP. Les bactéries ont été isolées aux plus fortes dilutions et la purification des isolats a réduit le nombre des bactéries (22 souches) isolées à 6 souches compétentes qui ont maintenu leur fort potentiel de dégradation du phénanthrène (PHE) même après leur culture sur milieu un riche. Ces souches bactériennes représentant les populations les plus dominantes au sein des différentes fractions d'agrégats sont Gram-négatives, en forme de bacille de différentes tailles (tableau 15) et sont mobiles (possèdent des flagelles polaires). L'identification phénotypique (Biolog) indique que ces isolats bactériens appartiennent essentiellement au genres *Xanthomonas*, *Pseudomonas* et *Burkholderia*.

Tableau 15 : Caractéristiques des souches bactériennes isolées

Souche	Source d'isolement	Gram	Oxydase	Catalase	Mobilité*	Taille (µm)
NAP1	Sables	-	+	+	+	1 x 3
NAH1	Sables	-	+	+	+	1 x 2,3
NAH4	Limons grossiers	-	+	+	+	0,5 x 2
NAP6	Limons fins	-	+	-	+	0,7 x 2
NAH6	Limons fins	-	+	+	+	0,6 x 2
NAH8	Argiles	-	+	-	+	0,5 x 1,5

* la mobilité est déterminée par la présence de flagelles au microscope électronique.

Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et l'analyse comparative des séquences a permis de classer ces souches en différentes espèces : *Burkholderia sp.* (souche NAH1 : AF247815 et souche NAP1 : BankIt390884-AF361021), *Herbaspirillum sp.* (souche NAH4 : BankIt390888-AF361023), *Ralstonia sp.* (souche NAH8 : BankIt390887-AF361022) et *Stenotrophomonas sp.* (souche NAP6 : BankIt390889-AF361024).

Le groupe de bactéries dégradantes appartenant à *Burkholderia* est présent dans les agrégats de grandes tailles (S et LG) avec de fortes proportions (42%) alors que, les fractions fines (LF et A) contiennent des bactéries dégradantes appartenant à trois différents genres (figure 14).

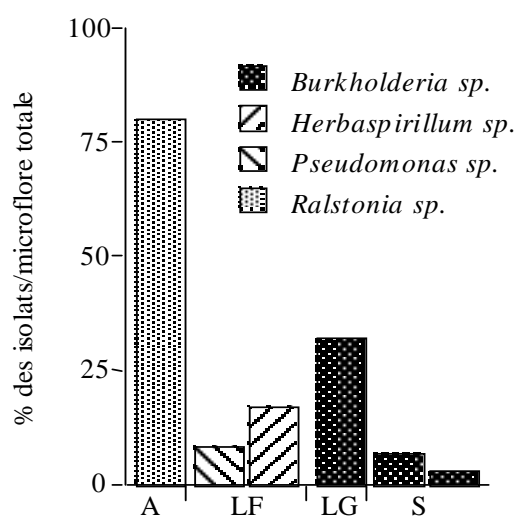


Figure 14 : Distribution de la fréquence des souches bactériennes dégradantes présentes dans différents agrégats (Sable : S, Limons fins : LF, Limons grossiers : LG et Argile : A) du sol de Bordeaux contaminé par des HAP.

Spécificité au substrat

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de phénomène de co-métabolisme des HAP, plus particulièrement dans le cas du fluorène (FLU). En effet, la croissance des 6 souches bactériennes en plaque de microtitration en présence du PHE non soluble (initialement ajouté dans une solution d'hexane) a été détectée après une semaine d'incubation par l'apparition d'une coloration orange (accumulation des métabolites de dégradation) mesurée à $DO_{405-620\text{ nm}}$ (tableau 16). Cette croissance est plus rapide après ajout de l'acide salicylique. En revanche, aucune de ces bactéries n'est capable de dégrader le FLU pris séparément ou en présence d'autres sources de C (glucose et succinate), même après 3 semaines d'incubation. Alternativement, les souches bactériennes NAH1 *Burkholderia sp.*, NAH8 *Ralstonia sp.* et NAP6 *Stenotrophomonas sp.* dégradent le FLU après ajout de l'acide

salicylique qui semble induire l'activité enzymatique dégradante vis à vis du FLU. Les souches NAP1 *Burkholderia sp.*, NAH4 *Herbaspirillum* et NAH6 (non identifié) ont montrés une spécificité vis à vis du PHE (tableau 16).

Tableau 16 : Spécificité au substrat des souches bactériennes isolées

Souche	Origine	HAP de croissance	Croissance bactérienne		
			glucose	Sources de carbones succinate	acide salicylique
NAH1	S	PHE	+	+	++
		FLU	-	-	+
NAP1	S	PHE	+	+	++
		FLU	-	-	-
NAH4	LG	PHE	+	+	++
		FLU	-	-	-
NAH8	A	PHE	+	+	++
		FLU	-	-	+
NAH6	LF	PHE	+	+	++
		FLU	-	-	-
NAP6	LF	PHE	+	+	++
		FLU	-	-	+

(+) et (++) correspondent à la vitesse d'un changement relatif de la densité optique dans l'apparition de coloration dans le milieu de croissance; (+) : après 1 semaine, (++) : moins d'une semaine et (-) : aucune croissance.

La croissance de ces bactéries en microplaque avec différentes sources de HAP est exprimée par la densité bactérienne relative obtenue à une longueur d'onde de 405-620 nm (figure 15). Elle montre que les souches bactériennes appartenant au même groupe et isolées de la même fraction d'agrégat présentent différentes caractéristiques de vitesse de croissance avec le phénanthrène (PHE) pris séparément ou en mélange avec l'anthracène (ANT) ou le fluorène (FLU) (figure 15). Les souches NAH1, NAH6 et NAH4 apparaissent comme étant les bactéries les plus efficaces en présence du PHE comme seul source de carbone. Les meilleures croissances sont observées dans les mélanges (PHE + FLU) ou (PHE + ANT + FLU) où elles sont très voisines.

III.1.2. Caractérisation d'une souche bactérienne dégradante

La bactérie utilisée est la souche NAH1 *Burkholderia sp.*, isolée du sol de Bordeaux, et plus particulièrement au niveau de la fraction d'agrégat de la taille des sables.

Le choix de cette bactérie pour cette étude a été aussi déterminé par la préparation d'un sérum spécifique permettant de la quantifier directement dans le sol.

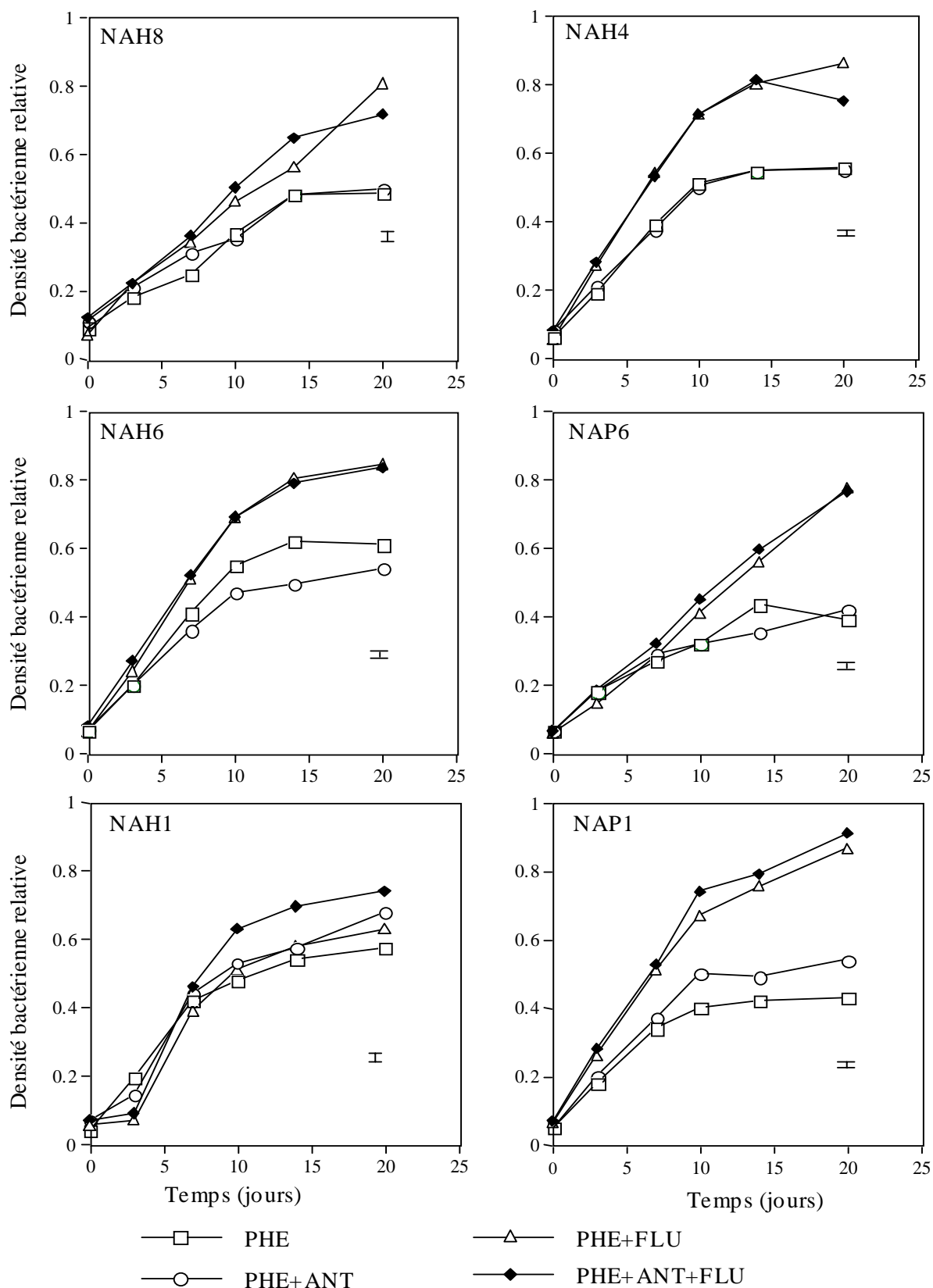


Figure 15 : Croissance (absorbance à 405-620 nm) des souches bactériennes en présence du phénanthrène (PHE) comme seule source de carbone ou en mélange avec l'anthracène (ANT) et le fluorène (FLU).

III.1.2.1. Dégradation du phénanthrène par la souche NAH1 *Burkholderia sp.*

L'incubation en batch de la souche NAH1 *Burkholderia sp.* avec les particules de PHE (concentration supérieure à la solubilité : 0,016%) dans un milieu minéral liquide (cf. § II.1.3-1) a montrée, après une observation microscopique, que cette espèce bactérienne forme plusieurs agrégats bactériens constitués d'une matrice polysaccharidique (biofilm) et adhèrent aux particules de PHE (figure 16). Une faible proportion de la population était sous forme de bactéries libres. Ceci suggère que la croissance de cette espèce bactérienne ne dépend pas seulement de la quantité de PHE qui passe en solution mais que cette bactérie, en s'adsorbant au PHE, est probablement capable de l'utiliser même en phase non soluble grâce à la production de biofilm (probablement un biosurfactant).

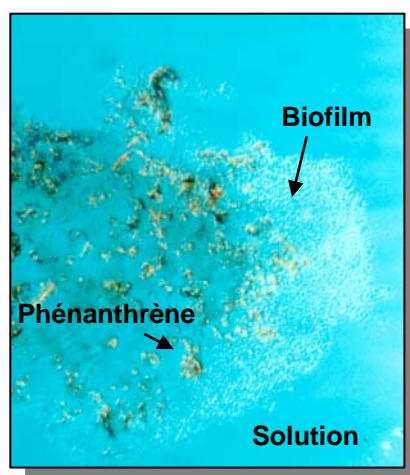


Figure 16 : Croissance de la souche *Burkholderia sp. NAH1* avec les cristaux du phénanthrène sous forme d'agrégats bactériens au sein d'une matrice polysaccharidique « biofilm »

La caractérisation de la surface cellulaire de la souche NAH1, particulièrement, l'hydrophobicité de la surface cellulaire quantifiée à l'aide de la méthode MATH (microbial-adhesion-to-hydrocarbons) a montré que cette souche présente une surface cellulaire relativement hydrophobe.

III.1.2.2. Minéralisation du 14 C-phénanthrène en culture pure

L'apport de nutriment (N/P : 2/1) a stimulé l'activité minéralisatrice de la souche *Burkholderia sp. NAH1* incubé (cf. § II.1.3-2) en milieu liquide avec du ¹⁴C-phénanthrène (figure 17). Alors que l'ajout du surfactant (Triton X-100) semble avoir un effet inhibiteur sur

l'activité minéralisatrice de la souche *Burkholderia sp.* NAH1 incubée dans les mêmes conditions avec le ^{14}C -phénanthrène.

La minéralisation incomplète du phénanthrène par la souche NAH1 en milieu liquide après 38 jours d'incubation en présence de la solution N/P peut être due, à la formation d'une fraction résiduelle stable du phénanthrène formée par l'adsorption du polluant aux parois du verre du flacon de culture.

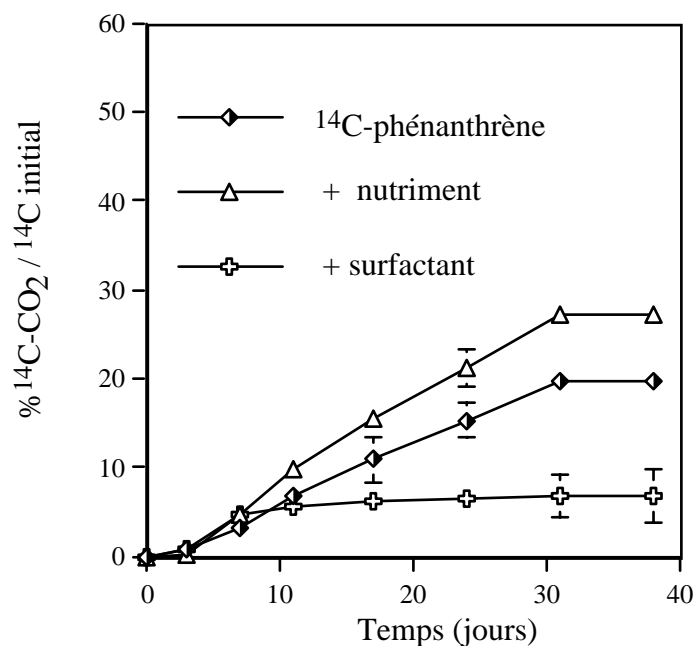


Figure 17 : Effet des nutriments (N/P: 2/1) et du Triton X-100 (0,15%) sur la minéralisation du ^{14}C -phénanthrène par la souche *Burkholderia sp.* NAH1 en milieu liquide.

III.2. Etude des processus de stabilisation/biodégradation des HAP dans les sols contaminés

Des expériences ont été conçues dans le but d'étudier les mécanismes impliqués dans la protection physique des HAP au sein des agrégats du sol en particulier par leur adsorption et piégeage dans les matières organiques. Ces expériences ont été réalisées dans des systèmes simplifiés où les paramètres physico-chimiques et microbiologiques sont à la fois contrôlés et modifiés avec un modèle de HAP (PHE). Compte tenu de leurs caractéristiques physico-chimiques les sols de Bordeaux (sableux, acide et à forte teneur en matière organique dans la fraction fine) et de Riedhof (argileux et très organique), ont été choisis pour cette étude.

III.2.1. Interaction des agrégats du sol avec les HAP

Afin d'élucider certains mécanismes responsables de la stabilisation préférentielle des HAP au sein de certaines fractions de sol, deux fractions d'agrégats du sol de Bordeaux, de taille (2000-50 μm et $< 2 \mu\text{m}$) et de teneur en C organique très différentes (0,3 et 25 %) respectivement, ont été contaminés avec le PHE puis incubés en condition de batch (cf. § II.2.)

L'incubation de ces deux classes d'agrégats (S et A) en présence de la souche *Burkholderia sp.* NAH1 a entraîné simultanément la solubilisation et la biodégradation du PHE. La biodégradation du PHE associé aux agrégats de la taille des sables et des argiles a été accompagnée par la libération de certains métabolites tels le 1,4-Naphthalenedione et le 1-Naphthalenol dans la solution aqueuse et ceci uniquement dans le traitement inoculé par la souche NAH1 (tableau 17).

Tableau 17: Dégradation du phénanthrène par la souche NAH1 dans deux classes d'agrégats du sol de Bordeaux contaminé par le phénanthrène et incubés en batch pendant 1 mois sous agitation mécanique.

Traitement	PHE soluble ($\mu\text{g/ml}$)	Composés métaboliques	
		1,4-Naphthalenedione	1-Naphthalenol
Agrégat non inoculé (2000- 50 μm)	3,3	-	-
Agrégat inoculé (2000- 50 μm)	2,1	+	+
Agrégat non inoculé ($< 2 \mu\text{m}$)	2,2	-	-
Agrégat inoculé ($< 2 \mu\text{m}$)	1,9	+	+

Présence (+) or absence (-) composés métaboliques.

Une forte concentration du PHE, passé en solution, a été détectée dans la phase aqueuse des agrégats grossiers (Sables) en présence de la microflore autochtone (traitement non inoculé) et ceci après 1 mois d'incubation. En revanche dans les agrégats fins de la taille des argiles, une plus faible quantité de PHE initialement fixé sur ces agrégats (contamination du sol sec) passe en solution (tableau 17). Comparativement pour les agrégats inoculés par la souche NAH1, de plus faibles concentrations de PHE ont été détectées en phase aqueuse (tableau 17). Ces différences dans les teneurs du PHE soluble sont probablement du d'une part, à la

biodégradation du PHE par la bactérie inoculé et les microorganismes autochtones et d'autre part, à l'adsorption du PHE aux agrégats argileux.

Dans le traitement non inoculé par la souche NAH1, une faible proportion de la biomasse bactérienne paraît capable de dégrader le PHE comme le montre le dénombrement (tableau 18). En revanche l'inoculation de la souche NAH1 a entraîné une augmentation significative du nombre de bactéries dégradantes. Des recherches ont montré que les vitesses de croissance des microorganismes en solution ou attachés aux agrégats du sol peuvent être similaires alors que la biodégradation peut être limitée par la vitesse de transfert des HAP en phase soluble (Harms et Zehnder, 1994).

Tableau 18 : Densité des bactéries dégradant le phénanthrène en suspension dans les agrégats du sol de Bordeaux après 1 mois d'incubation en batch sous agitation mécanique.

Fractions d'agrégats	Nombre de bactéries PHE-dégradantes (bact./ml)	
	Non inoculé	Inoculé avec NAH1
Sables	$< 10^2$ a	$7,1 \times 10^4 \pm 0,24$ c
Argiles	$2 \times 10^2 \pm 03$ b	$8,7 \times 10^4 \pm 0,26$ c

Les valeurs représentent des moyennes avec les erreurs standards correspondantes, calculées à partir de trois répétitions. Les moyennes suivies de la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

Le dosage du PHE dans la phase aqueuse de chaque échantillon d'agrégat a montré que la teneur du PHE soluble en solution dépasse sa solubilité (1.3 mg/l). Cet enrichissement en PHE soluble peut être dû à la production de surfactant par la bactérie inoculée et/ou les microorganismes autochtones (Liu et al., 1991). Des études ont déjà montrés que la solubilité du PHE augmente en présence des surfactants (Grimberg et al., 1995).

III.2.2. Bio-disponibilité et biodégradabilité du phénanthrène apporté aux sols expérimentaux

L'évaluation du degré de stabilisation du PHE sous forme de résidus non extractibles a été réalisée par extraction chimique mais aussi par l'intermédiaire de l'évaluation de sa bio-disponibilité vis à vis de la microflore autochtone et d'une bactérie dégradante (souche NAH1). Ceci a été effectué juste après amendement du sol avec du PHE (^{14}C) (avant incubation du sol) et après vieillissement de la contamination (stabilisation du PHE dans le sol).

III.2.2.1. Minéralisation du ^{14}C -PHE dans un sol sous l'influence de la microflore inoculé et autochtone au cours du vieillissement de la contamination

L'indicateur de bio-disponibilité utilisé est le dégagement de $^{14}\text{CO}_2$ provenant de la minéralisation du phénanthrène marqué ^{14}C .

Après une première période d'incubation (50 jours) du sol avec du ^{14}C -PHE à une température de 22°C , aucune minéralisation sensible n'est observée. En revanche, l'apport de nutriment et l'augmentation de la température (28°C) a stimulé la minéralisation du ^{14}C -PHE. L'inoculation de la souche NAH1 dans ces conditions augmente la minéralisation du ^{14}C -PHE dans le traitement inoculé par rapport au non inoculé. Cet effet ne s'est manifesté que dans le sol de Riedhof où le taux de minéralisation du ^{14}C - CO_2 est de $24,4\% \pm 1,4$ sans inoculation et $29,7\% \pm 1,9$ avec inoculation de la souche NAH1 (figure 18).

Ces résultats suggèrent qu'une microflore dégradante autochtone ne se manifeste qu'après une période de latence (adaptation, développement). L'apport de nutriments et l'augmentation de température ont stimulé cette activité.

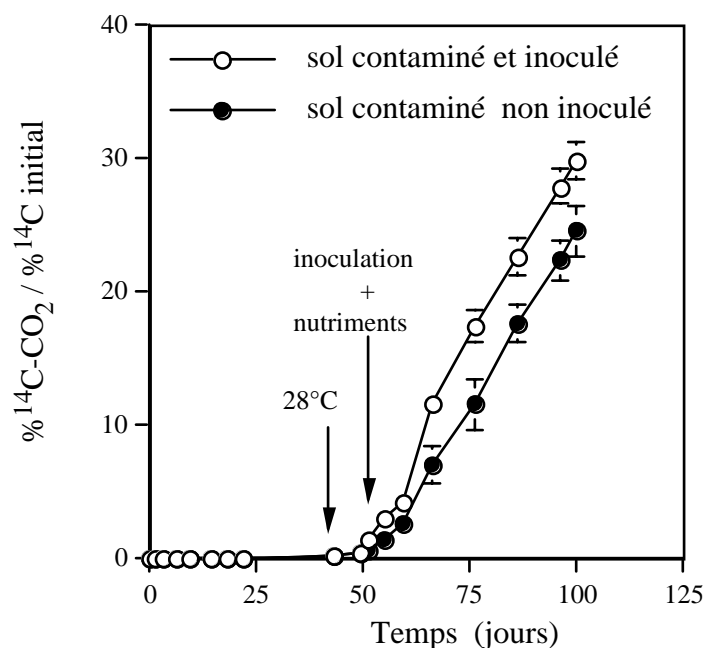


Figure 18 : Minéralisation du ^{14}C -phénanthrène par la microflore autochtone et la bactérie inoculée *Burkholderia* sp. NAH1 dans le sol de Riedhof avant et après apport de nutriments (N/P: 2/1).

III.2.2.2. Croissance des communautés bactériennes dans les sols contaminés

L'apport de nutriments après vieillissement du phénanthrène dans le sol de Riedhof a stimulé la croissance de la microflore dégradant le phénanthrène qui était inférieure à 1×10^2 par g de sol sec dans le sol initial (tableau 19). En revanche, l'inoculation d'une bactérie dégradante n'a pas augmentée significativement la densité de cette microflore. Cette bactérie détectée par ELISA (cf. § II.3.5) présente une population de $5,5 \pm 0,04 \times 10^5$ / g de poids sec parmi la microflore dégradante. A noter que dans les conditions expérimentales adoptées, aucune activité bactérienne dégradante n'a été détectée dans le sol de Bordeaux même après apport de N/P et inoculation bactérienne. Les résultats vérifient bien l'effet de l'apport de nutriments.

Tableau 19 : Effet de l'apport d'une solution nutritive (N/P: 2/1) et de l'inoculation bactérienne sur le nombre de bactéries (totales et dégradantes) dans le sol de Riedhof après 100 jours de contamination et d'incubation.

Traitement	NPP/g de sol sec de Riedhof	
	Microflore totale	Microflore dégradante
Biotique non inoculé	$1,9 \pm 0,3.10^8$ a	$< 10^2$
Biotique non inoculé + N/P	$2,5 \pm 0,6.10^8$ a	$5,5 \pm 0,2.10^5$ a
Biotique inoculé + N/P	$2,7 \pm 0,2.10^8$ a	$1,0 \pm 0,5.10^6$ a

Les valeurs représentent des moyennes avec les erreurs standards correspondantes, calculées à partir de trois répétitions. Les moyennes suivies de la même lettre au sein d'une même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$). Biotique signifie présence de la microflore autochtone.

III.2.3. Rôle de la matière organique du sol dans la stabilisation du phénanthrène et la formation des résidus non extractibles

La stabilisation des résidus de polluants dans les sols est directement liée à l'évolution de la matière organique de ces sols. C'est pour cette raison que des informations sur la distribution du PHE marqué au ^{14}C en fonction de la nature des constituants organiques peuvent permettre de comprendre et de contrôler les processus impliqués dans cette stabilisation.

III.2.3.1. Minéralisation du carbone organique total

Le suivi de la minéralisation du carbone organique total constitue un indicateur de l'activité microbienne globale au cours des incubations. Dans le sol de Bordeaux (BD) la

minéralisation du carbone total par la microflore autochtone est très rapide mais très faible, elle n'atteint que $0,7\% \pm 0,04$ C-CO₂ après une semaine d'incubation puis elle diminue. Alors que dans le sol de Riedhof (RD) le taux de minéralisation est plus limité, moins de $0,5\% \pm 0,07$ C-CO₂ après 50 jours d'incubation (figure 19) mais, la quantité minéralisée est beaucoup plus importante (28 mg C-CO₂ dans Riedhof et 1,2 mg C-CO₂ dans Bordeaux).

Cette minéralisation du carbone organique augmente mais reste très faible après ajout de la solution nutritive et augmentation de la température dans le sol de Riedhof (figure 19).

L'addition de 5 mg de phénanthrène (sol contaminé non inoculé) ne modifie pas les cinétiques de minéralisation du carbone organique dans le sol de Riedhof (figure 19). L'inoculation d'une souche dégradante dans ce sol après pré-incubation augmente le dégagement du CO₂ total (figure 19).

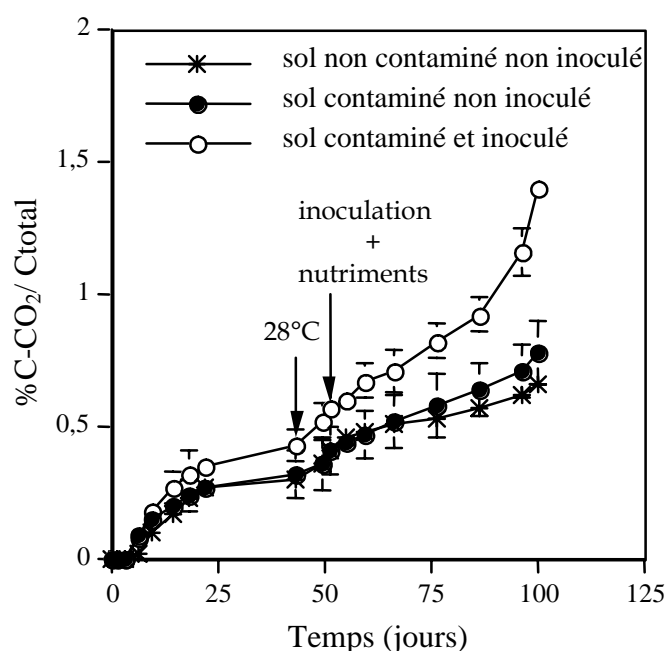


Figure 19 : Effet de l'apport de nutriments (N/P :2/1) et de l'inoculation bactérienne sur la minéralisation du carbone organique total dans le sol de Riedhof non contaminé et contaminé par ¹⁴C-phénanthrène.

III.2.3.2. Stabilité du phénanthrène dans les fractions organiques du sol

le devenir du ¹⁴C-PHE dans le sol a été déterminé en étudiant différentes voies de dissipation : la minéralisation en ¹⁴C-CO₂, l'extractibilité au solvant, le résidu non-extractible et sa distribution au sein de la matière organique (cf. § II.3.4.).

Les bilans de la radioactivité (fraction minéralisée, extractible et non extractible) réalisés avant et après 100 jours d'incubation dans les deux sols sont présentés dans la figure

20. La radioactivité résiduelle du phénanthrène dans les deux sols après contamination et sans incubation est essentiellement sous forme extractible ($42 \% \pm 1,4$ et $48 \% \pm 1,7$ respectivement, dans Riedhof et Bordeaux). Cette fraction représente seulement $30 \% \pm 2,2$ et $15\% \pm 1,0$ dans les traitements abiotiques (stériles sans activité microbienne) incubés respectivement, pour Riedhof et Bordeaux. Une nette diminution de la fraction extractible a été constatée dans le sol de Riedhof après apport de nutriments. L'inoculation bactérienne a conduit à une diminution importante de la fraction non-extractible (résidus liés) (figure 20).

L'incubation du sol de Bordeaux a entraîné une diminution de la fraction extractible bien qu'il n'y ait aucune activité microbienne. Cette diminution est compensée par la formation d'une importante quantité de résidus liés principalement localisés dans la fraction résiduelle dite humine.

Le dosage de la radioactivité dans la fraction non-extractible au chloroforme mais extractible au pyrophosphate-soude a montré qu'une forte proportion du ^{14}C -phénanthrène a été immobilisée dans la fraction acides humiques, acides fulviques mais que l'immobilisation la plus importante est associée à la fraction résiduelle dite humine quelque soit le traitement (figure 20).

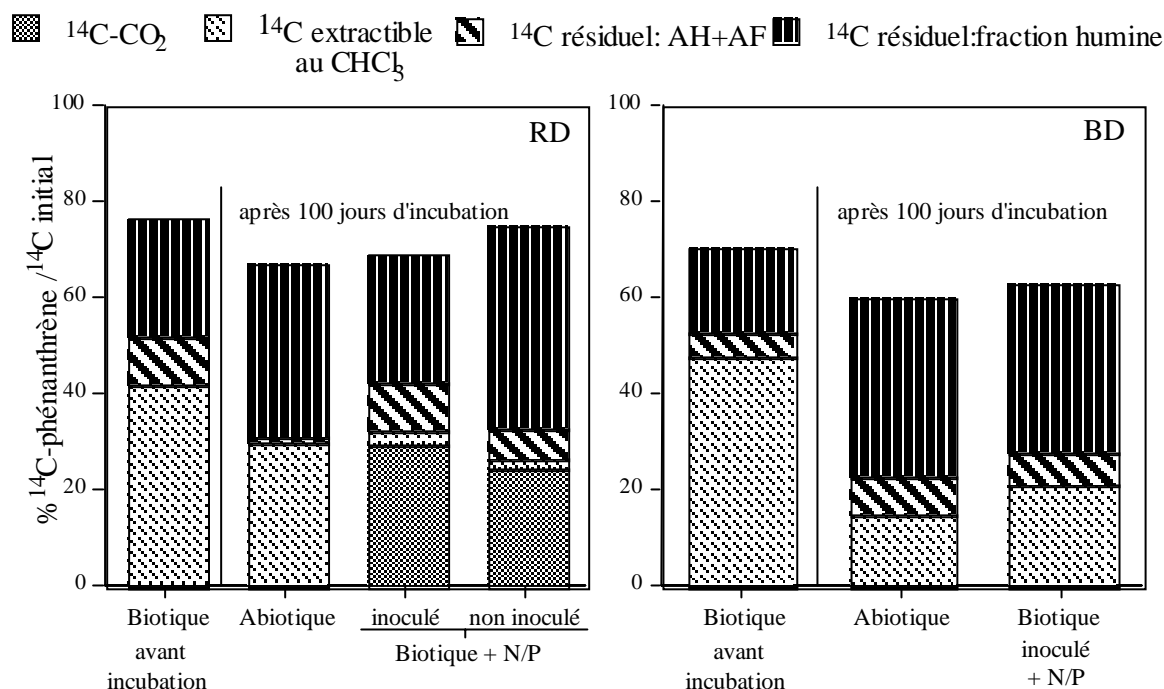


Figure 20 : Comparaison de la minéralisation et de la formation de fraction extractible au chloroforme et de résidus liés (associés aux acides fulviques + acides humiques et à la fraction humine) dans deux types de sol (RD: Riedhof et BD: Bordeaux) avant et après incubation.

Les bilans de la radioactivité retrouvée avant incubation des sols correspondent à 70 % à 76 % des apports. Ces bilans varient entre 60 % et 76 % après incubation des sols. Ce déficit dans les bilans pourrait être dû en grande partie, à des pertes par volatilisation non mesurées. Des pertes pendant l'incubation peuvent aussi être dues à une fixation sur les parois des flacons et des conduits du dispositif incluant le « barbotage ».

III.2.4. Effet de l'inoculation et d'un surfactant sur la bio-disponibilité du ^{14}C -phénanthrène

Le rôle de certains paramètres physico-chimiques (ajout de surfactant) et microbiologiques (inoculation bactérienne) dans l'amélioration de la bio-disponibilité du PHE a été étudié dans le sol de Bordeaux et de Riedhof sans vieillissement de la contamination. Dans ces expériences, l'inoculation d'une bactérie dégradante NAH1 et l'apport de surfactant ont simultanément suivi la contamination du sol par le phénanthrène.

III.2.4.1. Minéralisation et dissipation du ^{14}C -phénanthrène

En absence de la microflore autochtone, c'est à dire présence dans le sol de la population bactérienne inoculée seulement, on constate dans le sol de Bordeaux, une minéralisation très significative et très rapide du ^{14}C -phénanthrène qui atteint 40% en moins de 10 jours (traitement abiotique inoculé ; figure 21). L'apport d'un surfactant (Triton X-100) ralentit mais non significativement cette minéralisation. Quand la souche dégradante *Burkholderia* NAH1 a été inoculée dans le sol de Bordeaux, possédant encore sa microflore autochtone (traitement biotique inoculé), juste après sa contamination, la minéralisation est aussi très rapide et très forte dans une première phase et elle est voisine des autres traitements (figure 21). Elle se poursuit pour atteindre une phase stationnaire plus tardivement. La minéralisation est dans tous les traitements le processus le plus important de dissipation du ^{14}C -phénanthrène (figures 21, 22). Après 10 à 20 jours d'incubation à 28°C, la minéralisation du ^{14}C -phénanthrène atteint une phase stationnaire dans tous les traitements (figure 21). Après 50 jours d'incubation, 58% \pm 0,7 du ^{14}C -phénanthrène dans l'échantillon biotique inoculé et 44% \pm 0,9 à 42% \pm 1,1 sont minéralisés dans les échantillons abiotiques inoculés en présence ou en absence du Triton X-100. L'effet inhibiteur du surfactant sur l'activité minéralisatrice de la souche *Burkholderia sp.* NAH1 observé en milieu liquide (figure 17) ne se reproduit pas dans les deux sols (figure 21).

Dans le sol argileux organique de Riedhof, les allures des cinétiques de biodégradation-minéralisation sont différentes (figure 21). L'inoculation avec une bactérie dégradante entraîne une minéralisation plus rapide en début d'incubation mais elle ralentit rapidement. En présence de la microflore autochtone, la minéralisation est initialement plus lente mais se poursuit pour être finalement beaucoup plus importante (figure 21).

Le bilan dans le sol de Riedhof montre que seulement $39\% \pm 1,1$ de la radioactivité initiale du ^{14}C -phénanthrène sont minéralisés (figure 22) dans le traitement biotique inoculé, donc sensiblement moins que dans le sol de Bordeaux mais semble se poursuivre. La fraction résiduelle ne représente plus que $24\% \pm 1,4$ du ^{14}C initial, alors qu'elle est plus importante dans les traitements abiotiques inoculés où la minéralisation est très faible ($17\% \pm 0,9$). La minéralisation du phénanthrène dans le sol de Bordeaux se traduit par une diminution des fractions extractibles et résiduelles dans les traitements abiotiques inoculés comparativement au sol de Riedhof (figure 22). En revanche ces fractions sont beaucoup plus fiables dans le traitement biotique inoculé.

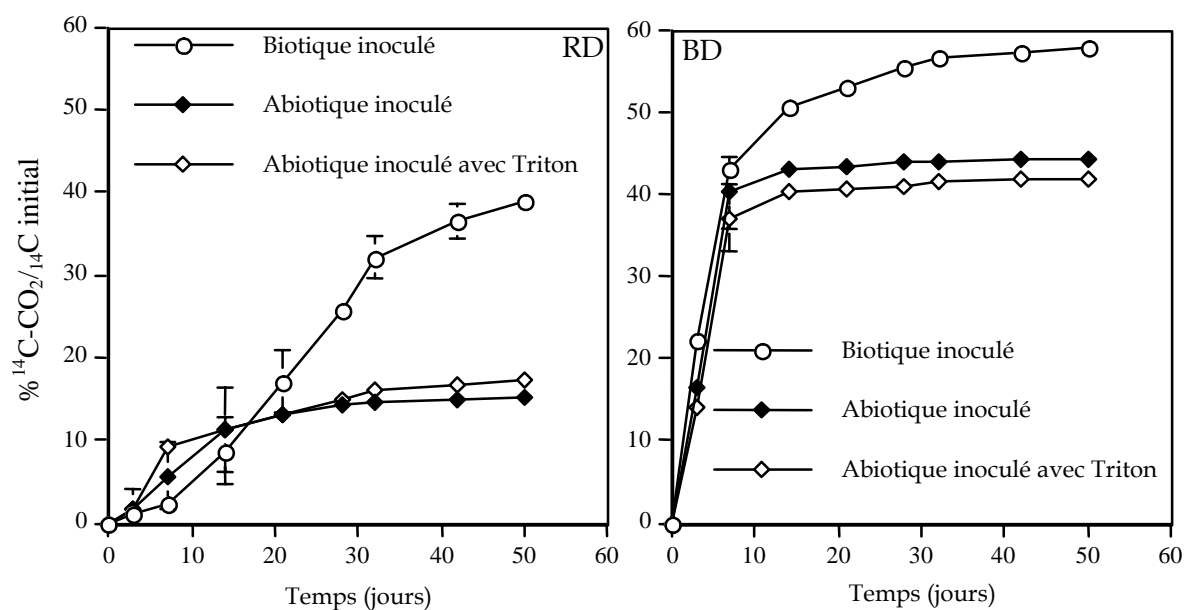


Figure 21 : Effet du Triton X-100 (0,15%) et de la microflore autochtone sur la minéralisation du ^{14}C -phénanthrène par la souche inoculée NAH1 dans deux types de sol (RD : Riedhof et BD : Bordeaux).

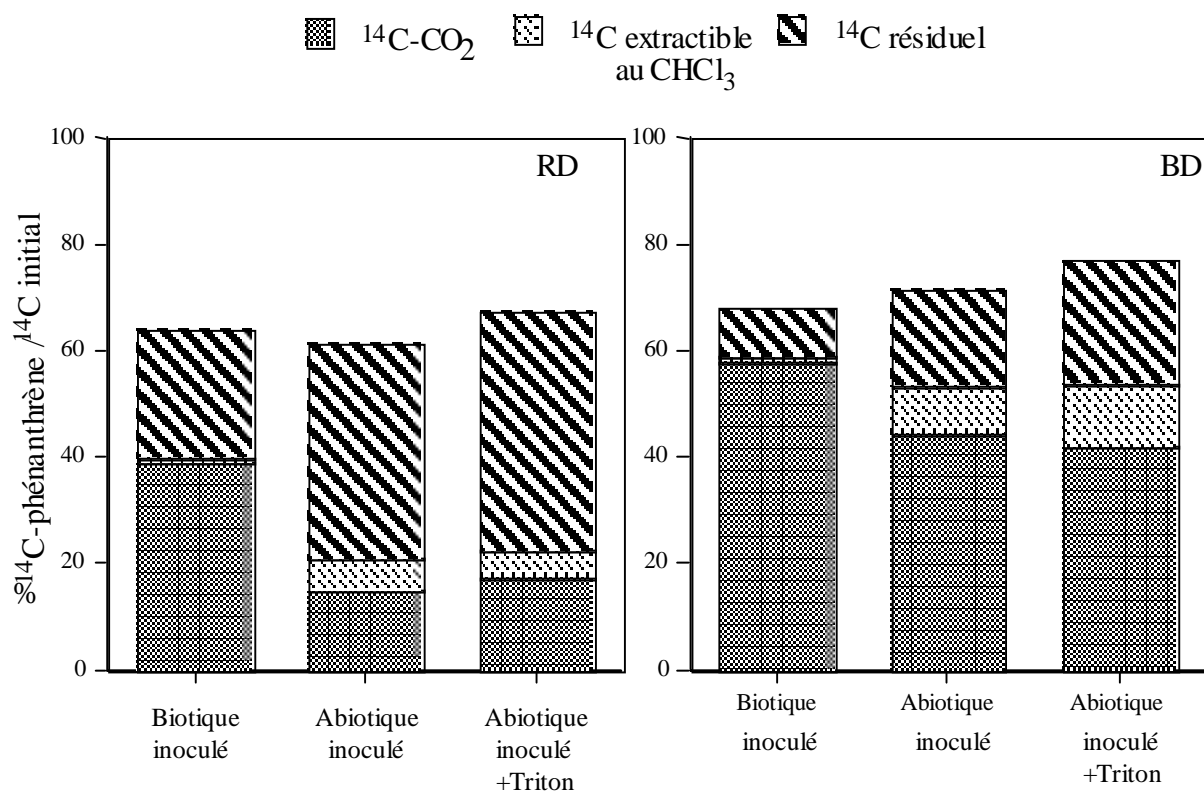


Figure 22 : Comparaison de la minéralisation et de la formation de fraction extractible et de résidus liés après inoculation de la bactérie dégradante directement après contamination des sols (RD : Riedhof et BD: Bordeaux).

III.2.4.2. Minéralisation de la matière organique

L'inoculation de la souche NAH1 seule dans le sol de Riedhof, c'est-à-dire en absence de la microflore autochtone, entraîne la minéralisation de la matière organique du sol dont 15% de phénanthrène. En présence de la microflore autochtone dans le même sol non pré-incubé (sans vieillissement de la contamination) la minéralisation de la matière organique n'est pas significativement modifiée (figure 23), alors que le phénanthrène est fortement minéralisé (40%) (figure 21) En revanche, un surplus du carbone minéralisé a été observé pour les échantillons abiotiques inoculés du sol de Bordeaux, $1,9\% \pm 0,6$ C-CO₂ après 1 semaine d'incubation. Cette effet de l'inoculation peut aussi correspondre à la minéralisation, au moins en partie, de la biomasse microbienne du sol. Le Triton X-100 semble diminuer la minéralisation du carbone organique par la souche inoculée uniquement dans le sol de Riedhof (figure 23).

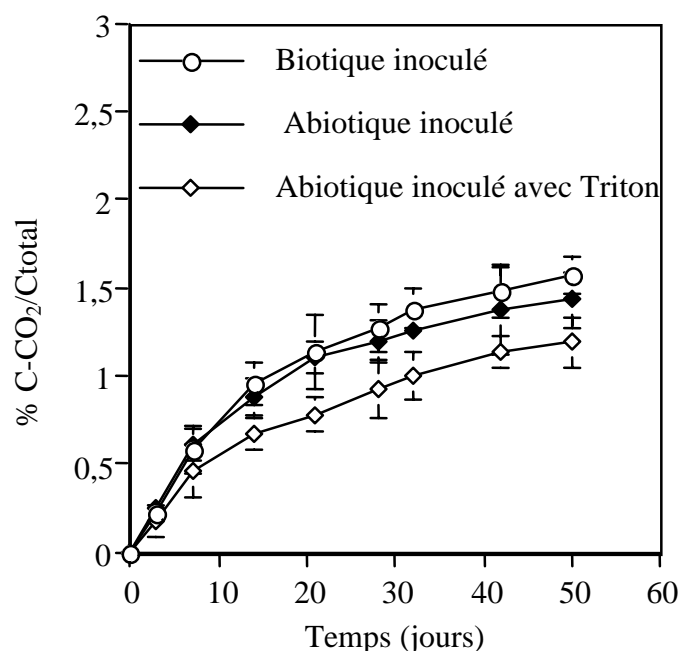


Figure 23 : Effet de l'inoculation bactérienne et du surfactant sur la minéralisation du carbone organique total, en présence et en absence de la microflore autochtone, dans le sol de Riedhof contaminé par le ^{14}C -phénanthrène.

III.2.4.3. Communautés bactériennes dégradantes

Bien que le nombre de micro-organismes dégradants dans les traitements biotiques et abiotiques des deux sols soit pratiquement similaire (tableau 20), la fréquence par rapport à la microflore totale n'est pas la même; elle passe de 5,9% à 50% dans le sol de Riedhof et de 13,2% à 36% pour Bordeaux respectivement, dans les traitements biotique et abiotique. Le Triton X-100 diminue significativement le nombre de micro-organismes dégradants.

Tableau 20 : Nombre de bactéries (totale, dégradante et inoculée) dans les deux sols contaminés et inoculés par une souche dégradante après 50 jours d'incubation.

Traitement	NPP/g de sol sec de Riedhof			NPP/g de sol sec de Bordeaux		
	Microflore totale	Microflore dégradante	Bactérie inoculée NAH1	Microflore totale	Microflore dégradante	Bactérie inoculée NAH1
Biotique inoculé	$2,2 \pm 0,3 \cdot 10^8$ a	$1,3 \pm 0,4 \cdot 10^7$ ab	$7,9 \pm 0,2 \cdot 10^6$ ab	$5,0 \pm 1,2 \cdot 10^7$ a	$6,6 \pm 0,1 \cdot 10^6$ ab	$4,9 \pm 0,3 \cdot 10^6$ a
Abiotique inoculé	$6,0 \pm 0,2 \cdot 10^7$ a	$3,0 \pm 0,3 \cdot 10^7$ a	$2,5 \pm 0,4 \cdot 10^7$ a	$3,6 \pm 0,6 \cdot 10^7$ a	$1,3 \pm 0,3 \cdot 10^7$ a	$9,9 \pm 0,3 \cdot 10^6$ a
Abiotique inoculé + surfactant	$9,0 \pm 0,9 \cdot 10^7$ a	$2,4 \pm 0,1 \cdot 10^6$ b	$1,8 \pm 0,1 \cdot 10^6$ b	$1,7 \pm 0,4 \cdot 10^7$ a	$1,1 \pm 0,3 \cdot 10^6$ b	$8,5 \pm 0,2 \cdot 10^5$ b

Les valeurs représentent des moyennes avec les erreurs standards correspondantes, calculées à partir de trois répétitions. Les moyennes suivies de la même lettre au sein d'une même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$).

L'inoculation de la souche NAH1 dans le sol de Riedhof et le sol de Bordeaux directement après leur contamination paraît efficace et permet une bonne installation et croissance parmi la population dégradant le phénanthrène : 61,5% et 75,8% des bactéries dégradantes respectivement, dans le sol de Riedhof et Bordeaux sont des bactéries NAH1 (figure 24). Dans les traitements abiotiques inoculés, c'est exclusivement la bactérie inoculée qui représente la microflore dégradante.

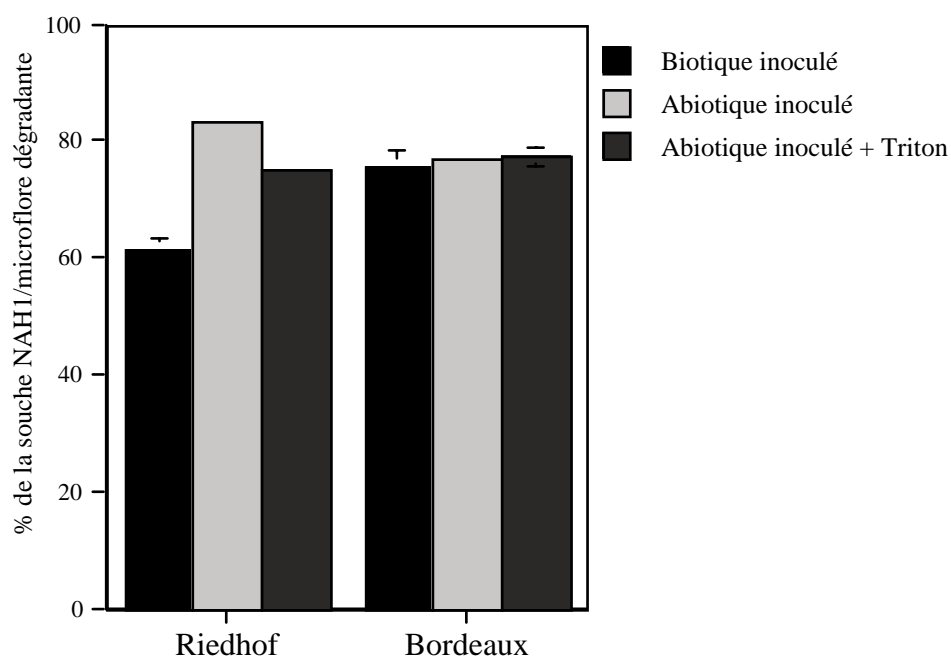


Figure 24 : Fréquence de la Burkholderia sp. NAH1, dénombrée par ELISA, par rapport à la microflore dégradante dans les sols contaminés.

IV. Discussion

IV.1. Nature des populations bactériennes dégradantes au sein des agrégats de sol contaminé

Si la majorité des recherches a porté sur la biodégradation des HAP par les souches bactériennes, peu d'études ont considéré la diversité génétique et fonctionnel des bactéries du sol dégradant les polluants organiques tels les HAP. Ces bactéries peuvent perdre leur capacité dégradante souvent portée au niveau d'un plasmide après leur croissance sur un milieu complet (Guerin et Jones, 1988).

La simplicité de la technique de microplaque de titration a permis le dénombrement, l'isolement et la caractérisation de souches bactériennes capables de croître en présence d'une

molécule de HAP prise séparément ou en mélange avec d'autres. Les résultats ont montré que pour une même fraction d'agrégat, les populations dominantes dégradantes au sein de cette fraction présentent une faible diversité. La capacité à dégrader le PHE est caractéristique de divers groupes génétiques (Foght et al., 1990). Cette diversité peut être établie comme l'indique nos résultats suite à des isolements de bactéries dégradant le PHE à partir de la première série d'isolement sur un milieu oligotrophe. Des milieux de culture complet, sont souvent utilisées pour isoler les bactéries dégradantes mais ceci entraîne une sélection de souches bactériennes qui ont un potentiel de dégradation très limité pour une utilisation *in situ*.

Dans notre étude, la diversité des bactéries dégradant le PHE est probablement sous-estimée puisque le critère de sélection était la stabilité de la capacité dégradante lors des étapes d'isolement et de purification des souches bactériennes. Les souches bactériennes isolées des fractions d'agrégats du sol de Bordeaux ne représentent pas toute les communautés bactériennes mais, uniquement les groupes dominants des bactéries capables de dégrader le PHE seul ou en mélange avec d'autres molécules de HAP. La majorité des espèces bactériennes, isolées à partir des classes d'agrégats du sol de Bordeaux contaminé par un mélange de HAP, appartiennent à des genres bactériens connus pour leur capacité à dégrader les HAP (Foght et Westlake, 1988 ; Juhasz et al., 1997). Quatre types d'isolats apparaissent et appartenant à 4 espèces : *Burkholderia sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Ralstonia sp.* et *Herbaspirillum sp.*

IV.2. Interactions polluant – adsorbant (phénanthrène – agrégat)

Les essais de biodégradation du phénanthrène par une bactérie dégradante en présence des agrégats du sol de Bordeaux ont permis de mettre en évidence la production de métabolites intermédiaires oxydés et hydroxylés. Le phénanthrène apporté en quantité supérieure à sa solubilité dans l'eau semble s'adsorber plus fortement aux agrégats de la taille des argiles que ceux de la taille des sables. L'inoculation d'une bactérie dégradante NAH1 limite la teneur du phénanthrène en phase aqueuse en contribuant à sa dégradation. Il est probable que la vitesse de biodégradation du phénanthrène par cette bactérie soit supérieure à la vitesse de transfert du substrat en phase aqueuse comme il a été observé par Efrogmson et Alexander (1994) qui suggèrent que la vitesse limitante de solubilisation du phénanthrène peut être augmentée par une production biologique de surfactants.

Récemment, Boucher et al. (1996, 1997) ont développé une méthodologie (continuous respirometry in diphasic system) qui permet de comparer les cinétiques de biodégradation obtenues aux caractéristiques de transfert du substrat de la phase organique (le substrat est apporté soit sous forme solide : cristaux, soit dissous dans un solvant organique) à la phase aqueuse. Appliquée à la dégradation du phénanthrène par une souche du genre *Pseudomonas*, cette méthodologie a permis de démontrer le mécanisme d'accession par solubilisation du substrat dans la phase aqueuse. Ce mode d'accession, probablement général, est insuffisant pour les HAP à plus faible solubilité. En effet l'utilisation de cette méthodologie dans le cas de la dégradation du pyrène (solubilité = 0,16 mg/l) laisse supposer l'existence d'une accessibilité et/ou biodisponibilité interfaciale directe dans la dégradation des HAP (Bouchez et al., 1996). L'existence de ce type de mécanisme permet de mettre en évidence les possibilités de dégradation significatives des HAP à plusieurs cycles aromatiques. Cependant, ce mécanisme interfaciale dépend fortement de l'existence d'une paroi externe hydrophobe chez la bactérie concernée (Bouchez et al., 1997).

Il existe une relation entre les mécanismes d'accessibilité (par solubilisation ou interfaciale), les microorganismes et les HAP impliqués. En effet, les bactéries du genre *Pseudomonas* utilisent les HAP à faible poids moléculaire (HAP les plus solubles dans l'eau) par croissance en phase aqueuse, tandis que les bactéries du genre *Rhodococcus* présentent des capacités à dégrader les HAP à fort poids moléculaire (Bouchez et al., 1997). Dans notre étude la souche NAH1 *Burkholderia sp.* présente une surface cellulaire relativement hydrophobe et adhère aux particules (cristaux) de phénanthrène en suspension dans milieu de culture. Ceci suggère que la croissance de cette espèce bactérienne ne dépend pas seulement du transfert du phénanthrène en phase aqueuse mais qu'elle présente des capacités de croissance interfaciale vis-à-vis du phénanthrène grâce à la formation de biofilm et à l'intervention possible d'un biosurfactant qu'elle développe autour des particules du phénanthrène.

Par ailleurs, les mécanismes par lesquels de tels substrats sont dégradés par les microorganismes doivent inclure une étape de diffusion depuis l'intérieur de la particule poreuse où ils sont adsorbés, pour devenir accessibles aux microorganismes fixés à la surface ou en suspension (Mihelcic et Luthy, 1991), sans toutefois impliquer nécessairement une solubilisation du composé en phase aqueuse. La lente diffusion des molécules à l'intérieur des micropores ou des phases hydrophobes les rend ainsi inaccessibles aux agents microbiens. Cette rétention au sein des microagrégats peut s'accompagner de la formation de résidus liés

avec la matière organique du sol (Hartzinger et Alexander, 1995 ; Jayr, 1997). En effet, au cours de nos essais de biodégradation (en batch) du phénanthrène adsorbé à des agrégats de la taille des sables et des argiles, une fraction importante de ce composé paraît adsorbée aux agrégats et plus particulièrement les argiles. Le piégeage physique du phénanthrène par « séquestration » dans la microporosité de ces microagrégats ne permet pas d'expliquer cette différence de comportement entre les agrégats de la taille des sables et ceux de la taille des argiles. Ceci est probablement dû à la teneur et la nature de la matière organique associée à la fraction argileuse

IV.3. Effet de la minéralisation de la matière organique sur le devenir du ¹⁴C-phénanthrène

La biodégradation du carbone organique du sol dépend de sa nature et du degré de sa stabilisation. La faible minéralisation du carbone organique par la microflore autochtone et la bactérie inoculée NAH1 dans les deux sols (Bordeaux et Rhiedhof) suggère une stabilité relativement importante qui peut être due à la bio-disponibilité limitée de cette matière organique, à la carence en nutriments, à une microflore adaptée insuffisante malgré la présence d'une communauté bactérienne importante. Des incubations des sols en suspension sous agitation en conditions aérées, sans ajout de phénanthrène et sans ajout de méthanol, ont montrés des taux de minéralisation faible du carbone organique ($2\% \pm 0,05$ après 30 jours et $1,5\% \pm 0,09$ après 20 jours d'incubation respectivement, dans les sols de Riedhof et Bordeaux). Les mêmes taux de minéralisations ont été obtenus après ajout de la solution nutritive.

L'inoculation bactérienne a permis une augmentation de la minéralisation du carbone organique total. Ceci peut conduire à une diminution de la fraction résiduelle du ¹⁴C-phénanthrène (inextractable au chloroforme). Dans le sol de Bordeaux, l'inoculation bactérienne et l'apport de nutriment après vieillissement de la contamination n'ont pas modifié la minéralisation du carbone organique total. Il en découle, après 100 jours d'incubation du sol la stabilisation et non extractabilité d'une importante fraction du ¹⁴C-phénanthrène (résidus liés), essentiellement associée au compartiment de la fraction humine, par des processus physico-chimique (absence d'activité bactérienne).

IV.4. Effet de l'inoculation d'une bactérie dégradante sur le devenir du ¹⁴C-phénanthrène

Dans les sols, il existe le plus souvent une faible proportion de bactéries aptes à se développer après une pollution et qui peuvent devenir majoritaires en dégradant les HAP (Thompson et al., 1999). Dans les deux sols étudiés, l'incapacité de la microflore autochtone à minéraliser le phénanthrène, dans la première période d'incubation, est à relier aux conditions du milieu (température: 22°C), à l'insuffisance de nutriments et à la stabilisation du phénanthrène au sein des constituants du sol. En effet, l'augmentation de la température (28°C) et l'apport d'une solution minérale ont permis une stimulation de l'activité microbienne et de la minéralisation du phénanthrène dans le sol de Riedhof à la différence du sol de Bordeaux où aucune activité dégradante n'a été détectée. L'inoculation d'une bactérie dégradante dans les mêmes conditions a stimulée la minéralisation du phénanthrène uniquement dans le sol de Riedhof. La technique ELISA a confirmé la présence de cette bactérie parmi la microflore dégradant le phénanthrène à des fréquences élevées dans le sol de Rhiedhof en présence de la solution nutritive. En effet, la faible proportion initiale des bactéries dégradantes ($< 10^2$ bact. / g de poids sec) après contamination du sol a été stimulée après apport de nutriments, mais cette population n'était pas compétitive avec la souche inoculée qui a pu coloniser et s'installer dans le sol.

Le sol sableux acide de Bordeaux semble fixer fortement le phénanthrène en absence de communautés bactériennes dégradantes. Cette rétention est probablement devenue irréversible après quelques jours d'incubation (50 jours) sans activité bactérienne. Une faible proportion du phénanthrène reste extractible alors qu'aucune minéralisation n'a été détectée après l'inoculation bactérienne et l'apport des nutriments. Le sol de Bordeaux possède une fraction argileuse modeste (essentiellement des smectites) mais qui probablement présente une surface spécifique élevée. Stella et al. (1990) ont montrés l'effet de la surface spécifique des fractions d'agrégats sur la stabilisation et le ralentissement de la biodégradation des polluants organiques. Même si une importante pollution résiduelle est souvent détectée lors des expériences de biodégradation dans les sols dépourvus ou pauvres en matière organique et en limons (Löser et al., 1998), la forte teneur en C organique des fractions fines (A et LF) du sol de Bordeaux (tableau 2) a probablement favorisé la rétention du phénanthrène en absence d'activité microbienne.

L'association des HAP avec la matière organique dans le sol peut se dérouler selon deux processus; d'abord une adsorption rapide aux sites des macromolécules organiques ensuite,

une phase d'adsorption plus lente "vieillessement" résultant de la diffusion des HAP aux sites d'adhésion internes (Weissenfels et al., 1992). Dans ce type de sol (Bordeaux), la deuxième phase d'adsorption semble jouer un rôle important dans la bio-disponibilité du phénanthrène puisque l'inoculation d'une bactérie dégradante et mobile après 50 jours de contamination n'a pas permis une minéralisation du phénanthrène probablement piégé dans les fractions fines, alors qu'elle s'observe quand l'inoculation suit immédiatement la contamination. De fortes concentrations en HAP ont souvent été observées dans les fractions fines due à leur forte affinité aux composés aromatiques de la matière organique du sol alors que les HAP qui sont associés à la matière organique particulaire au sein des fractions grossières semblent plus disponibles (Wilcke et al., 1996 ; Amellal *et al.*, 2001a, b).

Dans la deuxième série d'incubation, La bactérie inoculée *Burkholderia sp.* NAH1 s'est « installée » et maintenue dans les deux sols (BD et RD) à des densités très élevées en présence (traitement biotique) comme en absence de compétiteurs microbiens (traitement abiotique). Son inoculation directement après contamination des sols a permis une importante minéralisation du ^{14}C -phénanthrène, particulièrement dans le sol de Bordeaux. En minéralisant rapidement le phénanthrène, la bactérie inoculée a empêché la formation d'une importante fraction résiduelle (inextractable au chloroforme). Le ralentissement de la minéralisation après 10 jours d'incubation dans les échantillons abiotiques inoculés peut s'expliquer par la biodégradation de la fraction extractible du ^{14}C -phénanthrène qui correspond à la fraction disponible pour la minéralisation. Ceci n'étant pas observé pour les échantillons biotiques inoculés. Il pourrait y avoir un effet synergique entre microflore autochtone et microflore inoculée dans le traitement biotique ou une colonisation limitée de l'inoculum bactérien dans les traitements abiotiques. La plus faible minéralisation observée dans le sol de Riedhof stérilisé et inoculé directement après sa contamination se manifeste par une rétention plus forte du phénanthrène dans les traitements abiotiques inoculés (avec ou sans surfactant) que dans le traitement biotique inoculé. Le passage des phases inextractable-extractable du phénanthrène permettrait d'entretenir la minéralisation. Le facteur limitant serait alors la re-libération de la molécule mère ou des métabolites de dégradation (Schuttleworth et Cerniglia, 1995). La stérilisation du sol par autoclavage peut aussi changer considérablement les propriétés d'adsorption et de biodégradation de la matière organique et par conséquent la bio-disponibilité du phénanthrène (Park et al., 1990; Wild et Jones, 1993). Cet effet est plus prononcé dans le sol de Riedhof puisque la fraction résiduelle initialement très forte dans le sol stérilisé est restée pratiquement stable après inoculation bactérienne. De

plus, le ^{14}C de la fraction extractible au chloroforme représente à la fois la molécule mère et les métabolites de dégradation, il est donc difficile de conclure si c'est le phénanthrène ou ses métabolites qui sont présents dans cette fraction. Dans le sol de Riedhof, l'effet synergique qui se manifeste entre la bactérie inoculée et la microflore autochtone en favorisant la minéralisation du phénanthrène après une phase de latence plus au moins marquée que dans les sols préalablement stérilisés peut être due à ces différences de propriétés de matières organiques due entre autre à l'autoclavage des traitements abiotiques.

Le traitement témoin stérilisé (sol contaminé et non inoculé) permet de vérifier que la dégradation est d'origine biologique et que la formation spontanée d'une quantité de résidus liés principalement associés à la fraction résiduelle dite humine dépend de l'activité microbienne. Par ailleurs, la faible proportion du ^{14}C -phénanthrène inextractable formée juste après contamination du sol (sol avant incubation) suggère diverses phases et processus mis en jeu dans la formation des résidus liés. Des processus physico-chimiques (adsorption du ^{14}C -phénanthrène avec les substances humiques du sol) se manifesteraient rapidement, et pourraient être suivis au cours de l'incubation, de processus qui feraient intervenir l'activité microbienne (formation de liaisons avec les produits de dégradation du phénanthrène et de la matière organique). Les processus physiques de diffusion dans la microporosité se manifesteront plus lentement. Des expériences de dégradation chimique ont montré que les métabolites issues de la transformation des HAP peuvent former des liaisons covalentes (liaisons esters) avec la matrice organique du sol (Richnow et al., 1998).

IV.5. Rôle de la fraction acides humiques et acides fulviques dans la formation de résidus liés

On constate, dans les deux types d'échantillon de sol, que les acides humiques et fulviques (extraction pyrophosphate de sodium-soude) sont associés à du ^{14}C -phénanthrène ou à ses produits de dégradation et que plus de 10% de la radioactivité introduite peuvent, avant et après incubation en condition biotique et abiotique, y être localisés. Dans notre cas, il s'agit essentiellement des acides fulviques. Ce type d'association correspond sans doute à une fraction plus facilement mobilisable et renouvelable sous l'action de l'activité microbienne. En effet, la formation des résidus liés dans les sols peut se faire par l'établissement de liaisons covalentes qui nécessite la formation de molécules intermédiaires (métabolites) pouvant réagir avec les substances humiques (Burgos et al., 1996).

IV.6. Effet du surfactant sur la minéralisation du ¹⁴C-phénanthrène par la souche inoculée

Bien que certains surfactants stimulent la biodégradation des HAPs dans des systèmes liquides ou solides, leur application à des concentrations supérieures à la concentration micelle critique (CMC) entraîne une toxicité vis à vis des micro-organismes (Laha et Luthy, 1992). Cependant, ce n'est qu'à des concentrations supérieures à la CMC qu'ils améliorent la mobilité et augmentent la solubilité des HAP dans le milieu (Edward et al. 1991). Afin d'éviter le piégeage du phénanthrène dans les micelles et par conséquent sa faible disponibilité vis à vis de la bactérie, le Triton X-100 a été ajouté à une concentration inférieure à la CMC (CMC = 0,2%). Néanmoins à une telle concentration, la minéralisation du phénanthrène par la souche NAH1 en milieu aqueux a diminué. Cette inhibition n'est pas due à un effet de toxicité du surfactant puisque des tests préalables ont montrés que le Triton X-100 n'est pas utilisé comme source de carbone et n'est pas toxique pour la croissance de la souche NAH1. La densité de *Burkholderia sp.* NAH1 en milieu liquide après 38 jours d'incubation avec le ¹⁴C-phénanthrène était similaire ($8,3 \cdot 10^6$ bact/ml) pour tout les traitements. Le Triton X-100 semblerait modifier le métabolisme du phénanthrène par la souche NAH1 uniquement en milieu liquide minéral en culture pure (Bushnell Hass) mais pas dans le sol.

IV.7. Effet de l'apport de nutriments sur la minéralisation du ¹⁴C-phénanthrène

L'ajout de nutriments (azote et phosphore) ne semble pas stimuler très significativement la vitesse de dégradation de composés organiques autres que le phénanthrène ni par les micro-organismes autochtones ni par la souche inoculée dans le sol de Riedhof. Ces nutriments favorisent le métabolisme de dégradation du phénanthrène à la fois par la microflore autochtone du sol de Rhiedhof et par la bactérie inoculée bien que leur apport soit inférieure à celui habituellement utilisé pour les études de bio-remédiation (Berthelin et al., 1995). En revanche, l'ajout de nutriments n'affecte pas les processus microbiens dans le sol de Bordeaux. L'apport de nutriments n'augmente la vitesse de dégradation dans les sols pollués que lorsque les réserves d'azote et de phosphore disponibles dans le sol sont épuisées (Johnson et Scow, 1999). Dans des sols comme celui de Riedhof, l'azote est présent en teneur relativement importante et c'est plutôt sa disponibilité liée à ses différentes formes qui limite la biodégradation. L'ajout des nitrates stimule fortement le métabolisme des HAP quand ils sont utilisés comme accepteur d'électron (Leduc et al., 1992).

V. Conclusion

Une étude de la diversité phénotypique et génotypique a montré que les bactéries dégradant le phénanthrène étaient en majorité, dans les sols étudiés, des bactéries Gram-. Ces souches appartiennent principalement au genre *Burkholderia*. Une de ces souches bactériennes a été dans un premier temps inoculée aux agrégats de la taille des sables et des argiles afin d'étudier l'incidence des processus d'immobilisation du phénanthrène sur sa biodégradation. Les résultats de ces essais ont montré qu'il existait bien des interactions entre les constituants du sol et les HAP qui tendent, par la rétention de ces composés sur les agrégats du sol, à en limiter le transfert en phase aqueuse. Cette rétention plus marquée pour les agrégats de la fraction argileuse est probablement due à des phénomènes de diffusion des molécules dans la microporosité des agrégats argileux où elles sont physiquement piégées mais aussi aux interactions organiques- organiques (formation de résidus liés).

Les expériences visant à définir la disponibilité et la biodégradation du phénanthrène dans deux sols artificiellement contaminés par le ^{14}C -phénanthrène et inoculés par cette bactérie dégradante *Burkholderia sp.* NAH1 ont montré d'une part, que les processus de biodégradation ne sont pas identiques dans les deux sols et d'autre part, que les conditions du milieu : pH, température (28°C), humidité (capacité au champs) doivent présenter des conditions physiologiques favorables pour la croissance et l'activité de la bactérie inoculée. Quand la microflore adaptée à la minéralisation ne s'est pas développée, la formation de résidus liés qui sont associés à la fraction « humine » et aux acides humiques et fulviques était plus rapide et a limité la disponibilité de la fraction rapidement minéralisable, particulièrement dans le sol de Bordeaux. En revanche, une importante minéralisation du phénanthrène s'est manifestée pendant les 10 jours qui suivent l'incubation du sol sableux (Bordeaux) inoculé directement après sa contamination, alors que dans le sol argilo-limoneux (Riedhof), une période de latence était nécessaire avant que la minéralisation devienne intensive. Cette minéralisation diminue avec le temps et atteint une phase stationnaire dans les deux sols bien que du phénanthrène soit toujours présent mais sous forme peu ou non extractible. Plusieurs phénomènes peuvent être à l'origine de la stabilisation du phénanthrène et de la formation de fractions résiduelles non-extractibles dans les deux sols. Les matières organiques jouent un rôle fondamental comme le montre l'association "phénanthrène-fraction humique et fulvique". Il y a compétition entre minéralisation et formation de « résidus liés »

qui constituent les deux principales voies de dissipation des polluants organiques. Ces phénomènes sont contrôlés entre autre par la présence d'une microflore active.

L'absence d'un marquage uniforme de la molécule (marquage sur C9) ne permet pas de distinguer les sites préférentiels de la dégradation du phénanthrène qui peuvent être situés au niveau du C1, C3 et C9. La production de $^{14}\text{C-CO}_2$ est donc plus au moins significative soit d'une dégradation complète de la molécule soit de la formation de métabolites. Pour mieux définir ces phénomènes de biodégradation, il y aurait lieu d'une part, d'utiliser un marquage soit localisé différemment soit total et d'autre part, de rechercher les métabolites dans les différentes phases. Une localisation plus précise du ^{14}C résiduel dans les différentes fractions organiques et granulométriques des deux sols aiderait à la compréhension des phénomènes. La dynamique des bactéries inoculées pourrait être aussi précisée dans ces fractions en développant la méthode ELISA et l'associant à d'autres méthodes de reconnaissance. Enfin des modèles simplifiés de "résidus liés" mériteraient d'être utilisés expérimentalement.

Chapitre III :
Dégradation des hydrocarbures polyaromatiques sous l'effet des
contraintes nutritionnelles simulant la rhizosphère des plantes

Résumé

Après avoir étudié l'état des HAP dans le sol, les interactions existantes entre HAP et constituants du sol et les processus de biodégradation, on s'est intéressé au devenir des HAP dans un milieu assez spécifique et très complexe : la rhizosphère.

Le but de ce travail est d'étudier l'effet de la rhizosphère sur la dissipation des HAP, dans un sol industriel, en simulant les conditions rhizosphériques en l'absence de plantes. Ceci a été réalisé en apportant le carbone organique sous forme d'une solution synthétique d'exsudats racinaires et en contrôlant les quantités de l'azote et du phosphore dans le sol. Le comportement des microorganismes autochtones vis à vis des HAP dans ce sol industriel pollué tout en simulant les conditions rhizosphériques a été examiné.

Les résultats de ce travail sont présentés dans ce chapitre sous forme de publication.

L'effet d'une limitation en carbone, azote et phosphore sur la dissipation des HAP dans un sol industriel (3,1 g de HAP/kg) a été étudié en utilisant un modèle de rhizosphère. Le sol amendé quotidiennement par une solution artificielle d'exsudats racinaires (ER) et d'azote, présente une forte dissipation des HAP à trois et quatre cycles. L'ajout journalier au sol d'azote et de phosphore en présence ou en absence de la solution d'exsudats racinaires semble avoir peu d'effet sur la dissipation des HAP. Un traitement complet correspondant à l'addition d'exsudats racinaires, de l'azote et du phosphore montre une forte dissipation des HAP les plus lourds (5 cycles). Ces molécules de HAP à 5 et 6 cycles aromatiques sont détectés à des fortes concentrations dans la majorité des traitements et ceci peut être attribué à la désorption de ces molécules initialement non-extractibles dans le sol industriel.

Les bactéries dégradant les HAP atteignent un nombre très élevé dans le sol traité avec la solution d'exsudats racinaires, le phosphore et l'azote. Cette augmentation est également observée dans le traitement avec phosphore uniquement. La solution d'exsudats racinaire semble stimuler le nombre des bactéries totales dans le sol industriel et ceci quelque soit le traitement (ER seul, ER + N, ER + N + P) à l'exception de celui correspondant ER + P.

La dissipation des HAP dans le sol est probablement due aux processus de biodégradation et désorption. En présence d'une solution artificielle d'exsudats racinaires, la dissipation des HAP les plus lourds dans le sol industriel est apparemment gérée par la dégradation microbienne et/ou la biotransformation via un co-métabolisme.

I. Introduction

Le domaine du sol sous l'influence des racines des plantes ou rhizosphère, représente un habitat complexe avec un potentiel de biodégradation des polluants organiques de type HAP très important (Anderson et al., 1999 ; Walton et al., 1994). Plusieurs mécanismes ont été proposés incluant l'augmentation de la densité microbienne, l'amélioration des conditions physico-chimiques du sol dans cet environnement et l'adsorption des polluants dans la rhizosphère mais, ces mécanismes ne sont pas clairement élucidés. Des études ont été fondées sur l'hypothèse que les exsudats racinaires augmentent les communautés microbiennes dans la rhizosphère et ont abordés des travaux portant sur les interactions entre les plantes et les microorganismes pour la dégradation des HAP. Il apparaît que les plantes réagissent sous l'effet d'un stress chimique (toxicité des polluants) en augmentant et en modifiant l'exsudation racinaire qui entraîne des modifications dans la composition et l'activité de la microflore rhizosphérique (Walton et al., 1994). Cette communauté microbienne bien adaptée à ce type de stress modifie et peut augmenter la vitesse de transformation de ces composés toxiques pour les plantes. En effet, comme dans les sols non pollués (Leyval et Berthelin, 1983) dans un sol pollué on peut observer que, la densité et l'activité microbienne, par des mesures du nombre et de la respiration du sol, sont très élevées dans le sol rhizosphérique par rapport au sol non rhizosphérique (Günther et al., 1996). De plus, la dégradation et la vitesse de minéralisation des HAP a 4 cycles aromatiques de type pyrène semblent augmenter quand ces polluants organiques trouvés dans les exsudats racinaires ont été ajoutés (Reilley et al., 1996).

I.1. Biotransformation des HAP dans la rhizosphère

La rhizosphère est un compartiment très riche et constant pour les microorganismes car les racines prospectent un grand volume de sol et la microflore qui leur est associée bénéficie de la production massive de substrats carbonés facilement dégradables, sous forme d'exsudats racinaires. Les quantités de ces exsudats racinaires représentent de 12 à 40 % des composés issus de la photosynthèse (Campbell et Greaves, 1990). Ces exsudats sont formés principalement d'un mélange complexe de sucres, d'acides organiques et d'acides aminés (Schilling et al., 1998). De même, les paramètres physico-chimiques sont modifiés par les racines (Lynch 1990). Les flux des nutriments sont aussi plus importants du sol vers les racines que vers les solutions de sol, le pH est plus bas du fait de la production d'acides

organiques et de protons. Des études ont montré que la dégradation des HAP augmente dans la rhizosphère aussi bien au champ (Aprill et Sims, 1990) qu'en conditions contrôlées au laboratoire (Reilley et al., 1996 ; Binet, 2000), même pour les HAP les plus lourds comme le pyrène (Liste et Alexander, 2000). Les hypothèses pour expliquer cet effet rhizosphérique sur la biodégradation des HAP concernent surtout l'action des exsudats racinaires sur les populations bactériennes. Ainsi, le nombre de microorganismes et leur activité métabolique dans la rhizosphère sont corrélés positivement à la diminution des concentrations de polluants organiques (Günther et al., 1996).

1.2. Effet de la rhizosphère sur la dissipation des HAP

La phytoremédiation des polluants organiques est une approche qui utilise la rhizosphère, qui sous l'action physique des racines, présente l'avantage de confiner les pollutions en protégeant les structures et en stabilisant le sol mais surtout de former une niche écologique pour la microflore potentiellement dégradante. Des études ont indiqué que la présence des plantes augmente la dissipation des HAP (Reilley et al., 1996 ; Binet et al., 2000). En effet, l'activité des racines peut modifier certaines caractéristiques de la rhizosphère tel, le pH, la disponibilité d'O₂, CO₂, et les nutriments (Kaye et Hart, 1997 ; Hinsinger, 1998). De plus, la production massive en substances organiques facilement dégradables sous forme d'exsudats racinaires fait de la rhizosphère un compartiment riche pour la croissance des microorganismes.

La rhizosphère exerce une pression non seulement sur la biomasse et l'activité microbienne existante, mais également sur la sélection de différents groupes microbiens (Germida et al, 1998 ; Steer et Harris 200). Ces trois aspects de modification des caractéristiques du sol sous l'influence des racines (augmentation de l'activité microbienne, augmentation du potentiel d'oxydation, changement dans les communautés microbiennes) contribuent à l'effet positif que peut représenter la rhizosphère pour la phytoremédiation des polluants organiques.

Par ailleurs, les racines représentent une part importante de la biomasse du sol rhizosphérique. Elles absorbent l'eau et les nutriments du sol qui, avec le CO₂ de l'air et l'énergie du soleil, sont transformés en composés organiques par la photosynthèse. Les nutriments minéraux, principalement l'azote (N) et le phosphore (P) et leurs formes disponibles seront ainsi relativement limités dans le sol ce qui peut influencer l'activité microbienne (Jensen et Nybroe, 1999, Hodge et al. 2000) et probablement la dégradation des

HAP. En effet, il existe une compétition entre les microorganismes et les plantes, ainsi qu'entre les microorganismes pour les nutriments minéraux comme l'azote et le phosphore (Kaye et Hart, 1997). Ces nutriments sont essentiels au développement bactérien et constituent souvent des facteurs limitants pour la bioremédiation (Graham et al., 1999).

Des modèles de rhizosphère où le sol reçoit des exsudats racinaires synthétiques ont été déjà utilisés pour l'étude de la dynamique microbienne (Griffiths et al., 1999 ; Kozdroj et van Elsas, 2000) et de la dégradation des pesticides (Hsu et Bartha, 1977) et des hydrocarbures chlorés (Haby et Crowley, 1996). La possibilité de contrôler les quantités de carbone ajoutées permet d'utiliser cette approche dans le contexte de la dissipation des HAP dans le sol rhizosphérique.

1.3. Objectif de l'étude

Le but de cette partie de l'étude est de définir l'action des exsudats racinaires sur la dissipation des HAP dans un sol pollué en utilisant des systèmes simplifiés où des exsudats modèles remplacent la plante, et pour observer les modalités de nutrition et de compétitions microbiennes. Des résultats de travaux qui ont montrés l'effet positif de la phytoremédiation sur la dissipation des HAP ont suggéré le rôle majeur des exsudats racinaires retenus parmi les hypothèses avancées pour expliquer ces phénomènes. Néanmoins, ces études n'ont pas mis en évidence le lien existant entre les exsudats racinaires, les microflores associées et la biodégradation des HAP.

L'utilisation d'une solution d'exsudats racinaires synthétiques, en absence de plante, va permettre dans un premier temps d'étudier l'effet des exsudats dans un modèle très simplifié de la rhizosphère.

Les travaux de cette partie de la thèse ont été effectués en collaboration avec une équipe de recherche travaillant sur la dégradation des polluants organiques dans le sol rhizosphérique.

II. Matériel et Méthodes

II.1. Sol étudié

Le sol utilisé était fourni par ELF Atochem et provient d'un site pollué par des HAP, une ancienne cokerie du Nord de la France. Il s'agit d'un sol limoneux fortement organique à pH neutre, dont les caractéristiques physico-chimiques sont détaillées dans l'article. Il est riche en HAP à 3 et 4 cycles, les molécules majoritaires étant le phénanthrène (3 cycles) et le fluoranthène (4 cycles) sont présentés dans le tableau 1 de l'article.

II.2. Dispositif expérimental

Le suivi de la dégradation des HAP se fait dans des dispositifs en colonne en verre de 4 cm de diamètre et de 4 cm de haut. 40 g d'échantillon de sol sont placés dans ces colonnes et reçoivent différentes solutions nutritives de percolation ou de l'eau distillé (témoin). Les échantillons sont d'abord saturés avec de l'eau, puis laissés au repos pendant 12 heures. Le taux d'humidité est ensuite ramené à 70% de la capacité au champ grâce à une pompe à vide exerçant une pression de 9,2 KPa (soit pF 3) pendant 2 min. 4 ml de solution nutritive sont ajoutés chaque jours pendant 30 jours d'incubation à 20°C. Le temps de contact sol-solution est fixé à 20 min au bout du quel le système de pompage ramène les échantillons à la valeur d'humidité fixée. Les solutions de percolations sont ainsi récupérées puis stockés à -20°C pour les analyses du carbone et des HAP.

II.3. Solution nutritive d'exsudats racinaires

La solution nutritive d'exsudats racinaires est fabriquée à partir des proportions proposées par Griffith et al. (1999) : glucose, 50mM; fructose, 50 mM; saccharose, 50 mM ; acide succinique, 25 mM; acide malique, 25 mM; sérine, 12,5 mM ; arginine, 12,5mM; cystéine, 12,5 mM ; dont les concentrations sont ajustées pour obtenir une concentration finale de 100 µg de C par g de sol. Les solutions nutritives minérales en azote et phosphore contiennent du NH₄NO₃ (1 mM) et du NaH₂PO₄ (1 mM).

Huit solutions sont testées : eau (témoin), exsudats synthétiques (ER), azote (N), phosphore (P), ER+N, ER+P, N+P et ER+N+P. La proportion des éléments nutritifs, pour le traitement total C+N+P a un apport maximal C/N/P d'environ 100/30/30. Ce rapport offre les conditions non limitantes en N et P pour la croissance et le métabolisme bactérien.

II.4. Analyses

Les HAP dans le sol sont analysés après extraction au Soxhlet par du chloroforme (méthode décrite dans le chapitre I et dans l'article). La présence des HAP dans les percolats est déterminée par analyse au GC-MS (c.f. II.4 dans matériel et méthodes du chapitre I) après extraction liquide-liquide.

II. 5. Dénombrement des bactéries dégradantes

La méthode utilisée pour quantifier les communautés bactériennes dégradantes et totales est la même que celle utilisée dans les chapitres précédents (c.f. 2.4 de l'article).

III. Résultats

Les résultats sont représentés dans l'article joint.

IV. Discussion

IV.1. Dégradation des HAP dans dispositifs en colonnes simulant la rhizosphère

Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude montrent que les exsudats peuvent augmenter la dissipation des HAP dans le sol étudié. Bien évidemment, tester l'effet d'une solution d'exsudats racinaires paraît très réducteur du modèle rhizosphérique naturel tant au niveau physico-chimique que biologique. Les exsudats racinaires sont beaucoup plus complexes avec des compositions qui varient selon les plantes, leurs phases de croissance ou encore les stress environnementaux (Schilling et al., 1998). Les communautés microbiennes de la rhizosphère, qui sont très spécifiques n'ont probablement pas été stimulées dans le dispositif choisi.

De plus, les concentrations en N et P utilisées dans ce modèle (100/30/30) sont supérieures aux ratio C/N/P de 100/10/1 habituellement admis pour les études de bioremédiation (Berthelin et al., 1995). Néanmoins, les résultats obtenus montrent que les concentrations en N et P devraient être maintenues à des niveaux importants dans les études de phytoremédiation car les plantes prélèvent une grande quantité de nutriments au détriment des microorganismes. Le modèle expérimental conduit sur une courte durée dans cette étude a cependant mis en évidence certains paramètres dont il faut tenir compte dans les études de phytoremédiation, notamment, l'optimisation des conditions physico-chimiques de la rhizosphère et l'importance de la disponibilité des nutriments pour la biodégradation des HAP. Comparée au

expériences d'incubation du sol en batch, cette approche présente l'avantage d'avoir un contact permanent entre la matrice solide et la solution et permet une conservation de la structure du sol qui est proche de celle du sol *in situ* au champ. Par rapport aux expérimentations en pot de culture des plantes, le modèle utilisé est très rapide et permet un apport constant et une homogénéité des nutriments dans le sol. Le prélèvement régulier de la solution du sol pour une analyse des HAP et du carbone apporte des informations supplémentaires sur les processus intervenant dans les phénomènes de phytoremédiation.

IV.2. Effet des éléments nutritifs (C/N/P) sur la dégradation des HAP

L'effet des différents traitements utilisés sur la biodégradation des HAP est variable selon le nombre de cycles. La dégradation des HAP à 3 et 4 cycles aromatiques semble être limitée par les nutriments minéraux particulièrement l'azote, alors que la dégradation de ceux à 5 cycles nécessite la présence du carbone des exsudats racinaires avec les nutriments minéraux (N et P). Dans le premier cas, un métabolisme direct est probablement le plus important mécanisme intervenant dans la dégradation, puisque les HAP à 3 et 4 cycles sont généralement utilisés comme substrat de croissance pour les microorganismes souvent trouvés dans les sols pollués (Cerniglia, 1997). En revanche, la dégradation des HAP à plus fort poids moléculaire dépend entièrement d'un co-métabolisme.

L'importante dégradation des HAP à 5 cycles aromatiques en présence des exsudats racinaires et en conditions non limitantes en macro-nutriments, par rapport à celle obtenue en présence des exsudats seuls ou en association avec l'azote, montre que les nutriments minéraux limitent également la biodégradation des HAP par co-métabolisme et/ou le développement des communautés microbiennes intervenant dans ce processus.

L'enrichissement relatif observé dans le cas des molécules de HAP à 5 et 6 cycles aromatiques peut s'expliquer par une augmentation de l'extractibilité de ces composés. En effet, les HAP présents sous la forme de « résidus liés » avec la matrice organo-minérale du sol ne sont pas tous extractibles par la méthode du Soxhlet et leur concentration a été sous estimée initialement dans le sol avant incubation. Ceci a d'ailleurs été démontré dans le chapitre I lors du fractionnement granulométrique du sol pollué. La somme des HAP extractibles dans les différentes fractions d'agrégats du sol était supérieure aux HAP dans le sol initial avant fractionnement (Amellal *et al.*, 2001 ; 2001). Il est donc possible que les complexes contenant ces molécules soient déstabilisés en les rendant plus accessibles aux

solvants et que les traitements et/ou l'activité biologique modifient la matrice organo-minérale, en minéralisant les matières organiques. La stimulation de l'activité microbienne et le « lessivage » du sol même pendant une courte période ont pu également provoquer des changements rapides des conditions physico-chimiques du sol (pH, CaCO₃, dissolution, conductivité potentiel redox, pO₂/pCO₂) qui ont par conséquent affecté la désorption chimique des molécules de HAP. Si cette désorption a concerné également les HAP à plus faible poids moléculaire, la biodégradation des HAP à 3 et 4 cycles mesurée dans notre expérience a été probablement sous estimée puisqu'elle est résultante des HAP ayant été dégradés et ceux devenus extractibles.

V. Conclusion

Les exsudats racinaires synthétiques stimulent la microflore totale mais pas la microflore dégradante, contrairement aux traitements minéraux à base d'azote. En combinaison avec N et P, ils permettent une dissipation des HAP à 3, 4 et 5 cycles alors que les autres traitements ne favorisent que la dissipation des HAP les plus légers. L'apport de sources carbonées facilement utilisables par les microorganismes et un apport C/N/P élevé induit donc une augmentation de la dissipation des HAP.

Les mécanismes de dissipation des HAP dans la rhizosphère ne sont pas encore clairement définis et semblent très complexes. Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude montrent une dissipation des HAP, dans des dispositifs en colonnes, qui est probablement due essentiellement à l'action des microorganismes. Néanmoins, le co-métabolisme semble être un mécanisme important dans la dissipation des HAP à plusieurs cycles aromatiques, puisque aucun microorganisme n'est connu pour sa capacité à dégrader ces molécules. L'augmentation de la dissipation des HAP à 5 cycles pour le traitement complet ER/N/P et le traitement ER/N montre que les nutriments minéraux (essentiellement l'azote) limite la dégradation des HAP à travers le co-métabolisme ou le développement des communautés microbiennes dégradantes. Ceci a de fortes implications dans les phénomènes de phytoremédiation des molécules de HAP à plusieurs cycles aromatiques, puisque qu'il existe une compétition entre les microorganismes et les plantes pour les éléments nutritifs.

Les conditions favorables pour la biodégradation (température, humidité, pO₂ et la fréquence de fourniture de nutriments) utilisées dans le dispositif expérimental expliquent l'importante

vitesse de dissipation des HAP. Le temps d'incubation des sols dans les colonnes est relativement court comparé à celui imposé dans les expériences de phytoremédiation. Néanmoins, vu la rapidité de ce modèle expérimental simulant la rhizosphère, il serait intéressant de l'utiliser pour optimiser certains paramètres de la rhizosphère qui pourront aider à comprendre les processus qui interviennent dans la phytoremédiation des sols pollués.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les défis dans la gestion des sols anthropisés sont nombreux et importants, car l'étendue et l'intensité des impacts humains sur les sols sont plus élevées que jamais. Les dégradations physiques, chimiques et biologiques se manifestent très fréquemment. On observe aujourd'hui que d'importantes surfaces de sols considérés comme sols marginaux soumis à des contaminations et pollutions, sont mis en culture ou réutilisés pour diverses activités humaines. Leur utilisation change en raison de la forte expansion des villes et de leurs agglomérations, ou des gestions des agrosystèmes. Les pollutions diffuses et chroniques vont continuer à constituer des thématiques majeures de qualité de l'environnement et de la santé où le sol joue un rôle majeur. Des stratégies ont été développées pour protéger l'environnement et plus particulièrement les traitements biologiques grâce au microorganismes autochtones « atténuation naturelle » et /ou à l'inoculation d'autres microorganismes « bio-augmentation » et ceci en cherchant à tenir compte des conditions physico-chimiques de l'environnement (pH, O₂, nutriments, texture et structure du sol ...).

L'étude présentée dans ce mémoire sur le devenir et la dégradation des polluants organiques tels les HAP dans les sols vise à répondre à plusieurs questions sur les mécanismes et paramètres impliqués dans l'accessibilité et la disponibilité de ces polluants aux microorganismes dans les sols. Les sols industriels pollués ou plus généralement anthropisés (sols urbains au sens large) contiennent souvent de nombreux polluants et leurs métabolites de dégradation. Si l'on considère que la présence d'un composé a un impact sur la dégradation d'un autre, il est clair que les processus mis en jeu dans les sols pollués sont extrêmement complexes.

La dégradation microbienne des HAP dans des milieux complexes et des échantillons « environnementaux » est difficile à décrire au niveau des mécanismes impliqués. On s'appuie dans cette étude sur des paramètres voisins qui peuvent être mesurés : la taille de la population microbienne dégradante, la dissipation de composés ciblés, etc. Pour compléter ce type de données, des expériences en conditions contrôlées avec des sols artificiellement contaminés, ont permis la détection de métabolites et de voies de dégradation, de préciser l'impact de ces polluants sur les communautés microbiennes, de montrer les préférences microbiennes vis à vis des différents HAP et aussi la dégradation et la fixation irréversible des HAP aux différentes fractions organiques du sol.

Les expérimentations avec des sols artificiellement contaminés ont un avantage évident pour l'étude des relations cause-effet et pour l'interprétation des résultats même s'ils représentent des systèmes simplifiés dans lesquels toutes les interactions ne sont pas prises en compte. Les résultats des travaux effectués sur un sol industriel pollué et sur des sols représentatifs de milieux contrastés (acides ou neutres ; argileux ou sableux ; très organiques ou peu organiques) ont montré des relations étroites entre structure, texture du sol et localisation des HAP et des microorganismes dégradants :

- Présence plus importante de polluants dans les fractions d'agrégats fins de la taille des argiles et limons.
- Présence des bactéries dégradantes dans les mêmes fractions.
- Association préférentielle des HAP avec les fractions riche en matières organiques.

Les sols pollués par des HAP développent une microflore adaptée qui est plus importante que celle des sols non-pollués, en particulier pour les microflores dégradantes. Le temps précis nécessaire à cette adaptation et à ce développement mérite d'être précisé pour des situations bien définies (teneur en argiles, en matières organiques etc...). L'introduction d'organismes dégradeurs est rarement efficace. Dans nos expérience, une des bactéries sélectionnées pour leur mobilité et capacité à dégrader les HAP, *Burkholderia sp.* NAH1, s'est montré très efficace et très compétitive dans les deux types de sols contrastés (argileux organique neutre et sableux acide) contaminés artificiellement. Toute fois des expériences avec des sols pollués industriels sont probablement la voie la plus réaliste pour évaluer la dégradation d'un mélange complexe de polluants, de déterminer et d'exploiter les capacités dégradatives d'une microflore adaptée.

Les recherches menées au cours de cette étude ont démontré l'importance de différentes interactions qui se déroulent à l'interface de la matrice sol et les polluants organiques tels les HAP. Cette interface est habité par des communautés microbiennes variées qui contrôlent ou modifient ces interactions et qui profitent directement ou indirectement de la présence des ces composés organiques. On constate ainsi que les agrégats de la taille des argiles qui sont aussi riches en matière organiques fixent des quantités importantes de HAP comparativement aux agrégats de la taille des sables par ailleurs moins riches en matières organiques. En présence de ces différents agrégats, une bactérie inoculée dégradent les HAP et interagit aussi avec des particules de HAP, en formant un biofilm. Les processus qui se déroulent au niveau de cet interface affectent de nombreux aspects de la chimie et de

l'écologie du sol liés à la persistance des polluants dans le sol. La compréhension de ces processus demeure toujours incomplète, et le défi réside dans l'étude détaillée des mécanismes qui gèrent la stabilité et la bio-disponibilité de ces polluants.

Le vieillissement des pollutions, en contribuant à la stabilisation des polluants sous forme inextractible dans la matrice du sol joue un rôle fondamental sur la biodégradation qu'elle limite et sur la dissipation (diminution de la teneur extractible). La matière organique du sol et des fractions organiques comme les acides fulviques sont fortement impliquées dans la stabilisation et la formation de « résidus liés ».

L'inoculation d'une bactérie dégradante était très efficace dans les deux sols étudiés quand son apport au sol s'effectuait directement après la contamination par des HAP (sols sans vieillissement de la contamination). Les résultats concernant le vieillissement et le rôle des matières organiques des sols obtenus dans les modèles constitués d'échantillons de sol pourraient être validés *in situ*. Ces expériences pourraient en outre permettre de confronter les résultats obtenus lors des études de biodégradation, d'adsorption et de mobilité des HAP à des situations de pollution mixte (HAP et métaux) souvent rencontrés dans les sites industriels contaminés. En effet, la présence de plusieurs types de polluants qui peuvent présenter des effets toxiques limitant l'activité biologique et les processus de dégradation doit être prise en compte dans l'étude de bio-remédiation.

La caractérisation des processus microbiens (énumération des bactéries dégradantes, biomasse, structure de communautés bactériennes) des mécanismes de dissipation, de séquestration et de formation des métabolites des HAP doit être complétée par l'étude du co-métabolisme des HAP de poids moléculaire élevé. Ce type d'information aurait des conséquences importantes sur la bio-remédiation, car ce sont justement les HAP lourds qui sont les plus persistants et les moins facilement dégradables. Nos travaux ont adopté une première démarche qui consiste à étudier l'influence des apports organiques et des éléments minéraux sur la dynamique globale des HAP (cinétique de minéralisation, formation de résidus non-extractibles...). Ainsi l'apport de certains composés organiques simulant les exsudats racinaires ont bien montré le rôle bénéfique de ces apports organiques. Les résultats ont suggéré des mécanismes faisant intervenir des voies de co-métabolisme dans la dégradation des HAP et ont souligné l'impact des nutriments minéraux sur ce type de mécanisme.

Dans l'optique d'apporter des informations sur la possibilité d'intervention et/ou de régulation des phénomènes de stockage de polluants dans le sol, des expériences devraient être conçues afin d'étudier l'effet de l'apport de différentes matières organiques (paille, compost) sur la biodégradation des HAP récalcitrants. L'objectif étant d'étudier l'influence de matières organiques peu transformées (paille), ou ayant un degré d'humification avancé (compost).

Une autre application à souligner vise à proposer une utilisation efficace des microorganismes en présence et/ou en absence de la plante pour réhabiliter les sols pollués, c'est à dire utiliser une méthode peu coûteuse et respectueuse des propriétés physico-chimiques et biologiques des sols et de leur environnement.

Les mécanismes de dissipation des HAP dans la rhizosphère ne sont pas encore clairement définis et semblent très complexes, il serait donc intéressant de déterminer les interactions entre le sol, les microorganismes et les plantes ainsi que les paramètres d'une phytoremédiation efficace pour des polluants organiques tels les HAP.

Résumé

Pour étudier le comportement des contaminants organiques dans le sol, des travaux ont été effectués sur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en développant des approches analytiques d'étude *in situ* sur des sols « industriels » pollués et des approches expérimentales dans différents modèles (sols contaminés expérimentalement, cultures de microorganismes en systèmes complexes ou en modèles simplifiés, utilisation de composés contaminants modèles).

Dans des sols industriels pollués, l'étude de la localisation et de la distribution des HAP et des bactéries dégradantes montre et souligne l'importance des fractions granulométriques fines dans la disponibilité des polluants aux microorganismes du sol. Ces résultats sont confirmés par des études sur sols contaminés expérimentalement, avec par ailleurs une mise en évidence de la localisation préférentielle dans certaines fractions (fines ou riches en matières organiques). On constate aussi un comportement lié à la nature des molécules contaminantes qui se traduit par une dégradation et/ou une dissipation plus rapide des molécules à plus faible masse moléculaire (e.g. dégradation plus rapide des HAP à 3 noyaux aromatiques, qu'à quatre puis cinq noyaux).

Dans des systèmes simplifiés correspondant à des cultures en batch de bactéries dégradantes en présence d'agrégats du sol, on constate une adsorption et protection plus importantes des HAP sur les fractions argileuses.

Le vieillissement de la pollution contribue à fixer et stabiliser les polluants dans la matrice du sol et à diminuer la biodisponibilité, la biodégradation et la minéralisation des HAP.

Divers groupes de bactéries paraissent efficaces pour dégrader les HAP. Une de ces bactéries, isolée et étudiée en tant que bactérie modèle, colonise efficacement deux types de sol contrastés (sableux, acide et à faible teneur en matières organiques ; argilo-limoneux, neutre et à forte teneur en matières organiques) et dégrade efficacement des HAP comme le phénanthrène (marqué au ^{14}C). Cette dégradation est d'autant plus efficace que l'inoculation bactérienne suit la contamination et se fait avant le vieillissement de la pollution.

Les matières organiques du sol et en particulier les acides fulviques et humiques jouent un rôle fondamental dans la formation de « résidus liés » et dans la stabilisation des HAP. L'apport de nutriments peut favoriser l'activité bactérienne dégradante. En particulier les exsudats racinaires paraissent jouer un rôle fondamental favorable à la dissipation et biodégradation des HAP.

Les interactions « agrégats (structure du sol) – contaminants de type HAP – microorganismes » et les interactions « matières organiques – contaminants HAP – microorganismes » jouent un rôle fondamental dans le comportement et le devenir des polluants et des bactéries dégradantes.

Mots clés : Agrégats, Atténuation naturelle, Bactéries, Polluants organiques, Inoculation, Nutriments, Stabilisation

Abstract

To study the behaviour of organic pollutants in soil, work was involved with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) using analytical approaches for *in situ* study of « industrial » polluted soils and experimental approaches with different models (experimentally contaminated soils, culture of micro-organisms in complex systems or in simple model, organic model compounds).

Study of the location and distribution of PAH and PAH-degrading bacteria in industrially polluted soil, show the importance of soil structure and particularly fine fractions for the availability of pollutants to microorganisms. Similar results were found in a spiked soil showing a preferential accumulation of PAH and bacteria in some soil fractions (fines fractions or fractions with the highest content of organic C). The biodegradation of PAH is also influenced by their nature. The rates of dissipation and degradation of 3 ring PAH were above those with 4 and 5 rings.

In simple system corresponding to agitated batch incubation of bacteria with soil aggregates, an adsorption and physically protection of PAH were observed in clay aggregate fractions.

Aging of contamination lead to the fixation and stabilisation of pollutants to the surrounding soil matrix and to the low extractability, biodegradability and mineralization of PAH.

Various groups of bacteria were isolated for their high capacity to degrade PAH. One of these isolates was selected to study biodegradation of PAH in two contrasted soils (acidic sandy soil with low content of organic matter, loamy clayey soil with high content of organic matter) This strain colonised both soils and degrade highly the PAH such as phenanthrene (¹⁴C) especially when soils were inoculated at the same time as PAH contamination.

Organic matter of the soil, particularly fulvic and humic acids were involved in the formation of non-extracted residues and the stabilisation of PAH in soil.

Nutrient amendments increase the activity of PAH-degrading bacteria. The root exsudates seemed to be most important factor limiting the dissipation and biodegradation of PAH.

Interactions between « aggregates (soil structure) – organic pollutants as PAH – microorganisms » and also interactions between « organic matter – organic pollutants – microorganisms » have an important effect in the fate of organic pollutants and PAH-degrading bacteria.

Keywords : Aggregates, bacteria, Organic pollutants, Inoculation, Nutrients, Natural attenuation, Stabilisation,

- Amellal N., Berthelin J., Porta J-M. (2001) Effect of soil structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil of soil. *Appl. Géochim.* 16, 1611-1619.
- Amellal N., Berthelin J., Porta J-M., Vogel T. (2001) Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation* 12, 49-57
- Alexander M (1999) Biodegradation and bioremediation. Academic Press, San Diego, 453 pages.
- Anderson T A., Guthrie E A, Walton B T (1993) Bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2631-2636.
- Angers D.A., Chenu C. (1997) Dynamics of soil aggregation and C sequestration. In : *Soil Processes and the Carbon Cycle* R. Lal, J. Kimble, R. F. Follet & B. A. Stewart (Eds.), pp. 199-206. CRC Press, Boca Raton.
- Aprill W., Sims R.C. (1990) Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chem.* 20, 253-265.
- Arino S., Marchal R., Vandecasteele J.P. (1996) Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas species*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 45, 162-168.
- Ball W P., Roberts P V (1991) Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material. 2. Intraparticle diffusion. *Environ. Sci. Technol.* 21: 1201-1208.
- Ball W P, Roberts P V (1992) Long-term sorption of halogenated organic chemicals by aquifer material .1. equilibrium-comment. *Environ . Sci. Technol.* 26, 2301-2302.
- Balesdent J., Chenu C., Balabane M. (2000) Relationship of soil organic matter dynamics to physical protection and tillage. *Soil & Tillage Research.* 53, 215-230.
- Barr D.P., Aust S.D. (1994) Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28, 78-87.
- Barriusso E, Baer U, Calvet R (1992) Dissolved organic matter and adsorption-desorption of dimefuron, atrazine and carbetamide by soil. *J. Environ. Qual.* 21, 359-367.
- Barriusso E., Calvet R., Schiavon, M., Soulas G. (1996) Les pesticides et les polluants organiques des sols : Transformations et dissipation. *Etude et Gestion des Sols.* 3, 279-296.
- Bayard R. (1997) Etude de l'adsorption/désorption de polluants organiques dans les sols. Approche méthodologique et application au pentachlorophénol et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de doctorat. Lyon : INSA de Lyon, 231 p.
- Bayard R, Gourdon R, Barna L (1998) Influence of organic pollutants on sorption of naphthalene in contaminated soils. *Contaminated Soil 98 / proceedings of the 6th International FZK/TNO*, 17-21 May 1998, Edinburgh, UK. Thomas Telford Publishing : 2,pp. 849-851.

- Bayard R, Barna L, Mahjoub B, Gourdon R (2000) Influence of the presence of PAHs and coal tar on naphthalene sorption in soils. *J. Contam. Hydraul.* 46, 61-80.
- Besnard E., Chenu C., Balesdent J., Puget P., Arrouays D. (1996) Fate of particulate organic matter in soil aggregates during cultivation. *European Journal of Soil Science.* 47, 495-503.
- Berthelin J., Block JC., Dutarte P., Ferard JF., Henry AL., Leyval C., Morel JL., Munier-Lamy C., Sinaj S. (1995) Traitement biologique des sols pollués au cours d'activités industrielle : réflexions sur une grille méthodologique permettant de définir la faisabilité d'un objectif de dépollution, *Compte rendu du contrat d'Etude avec l'agence de l'EAU Rhin-Meuse.*
- Binet P., Portal JM., Leyval C. (2000) Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 32: 2011-2017.
- Bogan B.W., Lamar R.T. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading capabilities of *Phanerochaete Laevis* HHB-1625 and its extracellular enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1597-1603.
- Boonchan S., Britz ML. and Stanley GA. (1998) Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* 59: 482-494.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.P. (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 156-164.
- Bouwer E.J., Zehnder A.J.B. (1993) Bioremediation of organic compound-putting microbial metabolism to work. *Tib. Tech.* 11, 360-367.
- Bosma, T.N.P., Middeldrop, P. J. M., Schraa, G., Zehnder, A.J.B. (1997) Mass transfer limitation of biotransformation quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31, 248-252.
- Burd G., Ward O.PL. (1996) Involvement of a surface-active high molecular weight factor in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas marginalis*. *Can. J. Microbiol.* 42, 791-797.
- Breedveld GD., Karlsen DA. (2000) Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54: 255-261.
- Campbell R., Greaves M.P. (1990) Chapitre 2 Anatomy and community structure of the rhizosphere dans *The Rhizosphere* (J.M. Lynch, ed. Wiley-Interscience New-York).
- Cenci G., Caldini G. (1997) Catechol dioxygenase expression in a *Pseudomonas fluorescens* strain exposed to different aromatic compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 306-308.
- Cerniglia C E (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3 , 351-368.

- Cerniglia C.E. (1997) Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : past, present and future applications in bioremediation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19, 324-333.
- Chaineau C.H., Morel J.L., Oudot J. 1996. Land treatment of oil-based drill cuttings in an agricultural soil. *J. Environ. Qual.* 25, 858-867.
- Chin Y P, Aiken G R, Danielsen K M (1997) Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1630-1635.
- Chiou, C.T., Shoup, T.D. (1985) Soil sorption of organic vapors and effects of humidity on sorptive mechanism and capacity. *Environ. Sci. Technol.* 19, 1196-1200.
- Chiou C.T., Shoup T.D. (1985) Soil sorption of organic vapors and effects of humidity on sorptive mechanism and capacity. *Environ. Sci. Technol.* 18, 4-10.
- Chung GY., McCoy BJ., Scow KM. (1993) Criteria to assess when biodegradation is kinetically limited by intraparticle diffusion and sorption. *Biotechnol Bioeng* 41: 625-632.
- Chung G.Y., Alexander M (1998) Differences in sequestration bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils *Environ. Sci. Technol.* 32, 855-860.
- Christensen, B.T. (1992) Physical fractionation of soil and organic matter in primary particle-size and density separates. *Adv. Soil Sci.* 20, 1-90.
- Dec J., Bollag J M (1997) Determination of covalent and noncovalent binding interactions between xenobiotic chemicals and soil. *Soil Sci.* 162, 858-874.
- Devare M , Alexander M (1995) Bacterial transport and phenanthrene biodegradation in soil and aquifer sand. *Soil Sci. Am. J.* 59: 1316-1320.
- Déziel E., Paquette G., Villemur R., Lépine F., Bisailon J.G. (1996) Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908-1912.
- Edward D.A., Luthy R.G., Liu Z. (1991) Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solubilizations. *Environ. Sci. Technol.* 25, 127-133.
- Fan C.Y., Krishnamurthy S. (1995) Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils : a briefs review. *J. air. Waste. Manage. Ass.* 45, 453-460.
- Farrell J Grassian D , Jones M (1999) Investigation of mechanisms contributing to slow desorption of hydrophobic organic compounds from mineral solids. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1237-1243.
- Field J.M., de Jong E., Costa G.F., Bont J.A.M. (1993) Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Tib. Tech.* 11, 44-49.
- Foght J M, Westlake D W S (1988) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. *Can. J. Microbiol.* 34, 1135-1141.

- Foght J M, Fedorak P M, Westlake D W S (1990) Mineralization of [¹⁴C] hexadecane and [¹⁴C] phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.* 36, 169-175.
- Friedrich M., Grosser R G., Kern E A., Inskip WP., Ward D M. (2000) Effect of model sorptive phases on phenanthrene degradation: molecular analysis of enrichments and isolates suggests selection based on bioavailability. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2703-2710.
- Frostegard A., Tunlid A., Baath E. (1993) Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3605-3617.
- Giller K.E., Witter E., McGrath S.P. (1998) Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils : A review. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1389- 1414.
- Goyal A.K., Zylstra G.J. (1997) Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *J. Indus. Microbiol. Biotechnol.* 19, 401-407.
- Guerin W.F., Boyd S.A. (1997). Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents. *Wat.Res.* 31, 1504-1512.
- Guerin W, Jones G (1988) Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 937-944.
- Guggenberger, G., Zech, W., Haumaier, L., Christensen, B.T. (1995) Land-use effects on the composition of organic matter in particle-size separates of soils: II. CPMAS and solution ¹³C NMR analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 46, 147-158.
- Guggenberger G, Pichler M, Hartmann R., Zech W (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons in different forest soils. Mineral horizons. *Z Pflanzenernaehr. Bodenkd* 159, 565-573.
- Günther T., Dornberger U., Fritsche W. (1996) Effect of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere.* 33, 203-215.
- Graham D W, Smith V H, Cleland D L, Law K P (1999) Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. *Water Air Soil Pollut.* 111, 1-18.
- Germida J.J, Siciliano S.D., de Freitas J.R. Seib A.M. (1998). Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus L.*) and wheat (*Triticum aestivum L.*). *FEMS Microbiology Ecology* 26, 43-50.
- Griffiths B.S., Ritz K., Ebbelwhite N., Dobson G. (1999) Soil microbial community structure : effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochem.* 31, 145-153.
- Grimberg, S.J., Nagel, J., Aitken, M.D. (1995) Kinetics of phenanthrene dissolution in water in the presence of non-ionic surfactants. *Environ. Sci. and Technol.* 29, 1480-1487.
- Haby P.A., Crowley D.E. (1996) Biodegradation of 3-chlorobenzoate as affected by rhizodeposition and selected carbon substrates. *Journal of Environ. Quality.* 25, 304-310.

- Hanson J.R., Macalady J.L., Harris D., Scow K.M. (1999) Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil . *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5403-5408.
- Hartmann R. (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in forest soils : critical evaluation of a new analytical procedure. *J. Environ. Anal. Chem.* 62, 161-173.
- Harms, H., Zehnder, A.J.B., 1995. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 27-33.
- Hartzinger P.B., Alexander M. (1995). Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537-545.
- Heitkamp M.A., Franklin W., Cerniglia C.E. (1988) Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons : isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2549-2555.
- Hinsinger P. (1998) How do plant roots acquire mineral nutrients ? Chemical processes involved in the rhizosphere, In : Sparks, D.L. (Ed.). *Advances in Agronomy*, Vol. 64. Academic Press, San Diego, pp. 225-265.
- Hodge A., Robinson D., Fitter A. (2000). Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen ? *Trends in Plant Science* 5, 304-308.
- Horinouchi M, Nishio Y, Shimpo E, Rugsaseel S, Juntongjin K, Thaniyavarn S, Nojiri H, Yamane H, Omori T (2000) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from oil-contaminated Kuwaiti soil. *Biotechnology Letters* 22, 687-691.
- Huang W Schlautman M A Weber W J (1996) A distributed reactivity model for sorption by soils and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 30, 881-890.
- Hsu T.S., Bartha R. (1979) Accelerated mineralization of two organo-phosphate insecticides in the rhizosphere. *Applied and Environ. Microbiol.* 37, 36-41.
- Jayr E , Belkessam L, Daubies K, Lors C, Deschênes L, Gourdon R (2000) Behaviour and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in chalky environment: sorption and biodegradation. 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 25-29 October, Bordeaux, France.
- Jensen L.E., Nybore O. (1999) Nitrogen availability to *Pseudomonas fluorescens* DF57 is limited during decomposition of barley straw in bulk soil and in the barley rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4320-4328.
- Jocteur Monrozier L, Ladd JN, Fitzpatrick AW, Foster RC , Raupach M (1991) Components and microbial biomass content of size fractions in soils of contrasting aggregation. *Geoderma* 49, 37-62
- Johnson CR., Scow KM. (1999) Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation* 10, 43-50.
- Juhasz AL., Britz ML. and Stanley GA. (1997) Degradation of fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* 83, 189-198.

- Kan, A.T., Fu. G., Thomson, M.B. (1994) Adsorption/Desorption hysteresis in organic pollutant and soil/sediment interactions. *Environ. Sci. Technol.* 28, 859-867.
- Kästner M., Breuer-jammali M., Mahro B. (1994) Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 267-273.
- Kaye J.P., Hart S.C. (1997) Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *TREE* 12, 139-143.
- Kelley I., Cerniglia C.E. (1995) Degradation of a mixture of high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* strain PYR-1. *J. Soil Contam.* 4, 77-91
- Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M. (1997) Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31, 214-217.
- Kotterman M.J.J., Vis E.H., Field J.A. (1998) Successive mineralization and detoxification of Benzo(a)pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera sp.* strain BOS55 and indigenous microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2853-2858.
- Kozdroj J., van Elsas J.D. (2000) Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1405-1417.
- Knaebel D.B., Federle T.W., McAvoy D.C., Vestal J.R. (1996) Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: Effects of preadsorption to various soil constituents. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1865-1875
- Kukkonen J., Landrum P.F. (1996) Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. *Chemosphere* 32, 1063-1076.
- Kyoungphile N., Alexander M (1998) Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability : Tests with model solid. *Environ. Sci. Technol.* 32, 71-74.
- Laha S., Luthy R.G. (1992) Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.* 40, 1367-1380.
- Laor Y., Farmer W.J., Aochi Y., Strom P.F. (1998) Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral associated humic acid. *Wat. Res.* 32, 1923-1931.
- Leblond J.D., Schultz T.W., Sayler G.S. (2001) Observations on the preferential biodegradation of selected components of polyaromatic hydrocarbon mixtures. *Chemosphere* 42, 333-343.
- Leduc R., Samson R., Al Bashir B., Al Hawari J., Cseh T. (1992) Biotique and abiotique disappearance of four PAH compounds from flooded soils under various redox conditions. *Wat. Sci. Technol.* 26, 51-60.

- Lee K.E., Foster R.C. (1991) Soil fauna and soil structure. *Aust. J. Soil. Res.* 29, 745-775.
- Leyval C., Berthelin J. (1983). Effets rhizosphériques des plantes indicatrices de grands types de pédogénèse sur quelques groupes bactériens modifiant l'état des minéraux. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 20, 191-206.
- Lion L.W (1990) Sorption of hydrophobic compounds in aquifer materials: Analysis of methods and the effects of organic carbon. *J. Contam. Hydrol.* 5:, 215-234.
- Liu Z., Laha S., Richard G.L., (1991) Surfactant solubilization of polyaromatic hydrocarbons in soil water suspensions. *Wat. Sci. technol.* 23, 475-485.
- Liste H.H., Alexander M. (1999) Rapid screening of plants promoting phenanthrene degradation. *Journal of Environ. Quality* 28, 1376-1377.
- Löser C., Seidel H., Zehnsdorf A., Stottmeister U. (1998) Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 631-636.
- Lynch J.M. (1990) Chapitre I Introduction : some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil dans *The Rhizosphere* (J.M. Lynch, ed. Wiley-Interscience New-York).
- Mahjoub B., Jayr E., Bayard R., Goudron R. (2000) Phase partition of organic pollutants between coal tar and water under variable experimental conditions. *Wat. Res.* 34, 3551-3560.
- Manilal V.B., Alexander M. (1991) Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 401-405.
- Martins J. (1993) Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et biologiques du devenir des pesticides dans les sols : Application au transfert du pentachlorophénol en colonnes. Thèse de Doctorat Grenoble : Université J. Fourier, Grenoble I 305 p.
- Means J.C., Wood S.G., Hassett J.J., Banwart W.L. (1980) Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. *Environ. Sci. Technol.* 14, 1524-1528
- Morgan P., Watkinson R. (1992) Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the *in situ* biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Wat. Res.* 26, 73-78.
- Morgan D.J., Battaglia A., Hall B.J., Vernieri L.A., Cushney M.A. (1992) The GRI accelerated biotreatability protocol for assessing conventional biological treatment of soils: development and evaluation using soils from manufactured gas plant sites. GRI-92-0499. technical report. Gas Research Institute, Chicago, IL, USA
- Mueller J.G., Chapman P.J., Pritchard P.H. (1989) Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3085-3090

- Müller, S., Wilcke, W., Kanchanakool, N., Zech, W. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in particle-size separates of urban soils in Bangkok, Thailand. *Soil Science* 165, 412-419.
- Nam, K., Chung, N., Alexander, M. (1998) Relation between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* 32, 3785-3788.
- Ortega-Calvo J.J., **aiz-Jimenez** C. (1998) Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Applied and Environ. Microbiol.* 64, 3123-3126.
- Park K.S., Sims R.C., Dupont R.R., Doucette W.J., Matthews JE. (1990) Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 187-195.
- Pignatello J.J., Xing B. (1996) Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30, 1-11.
- Qiu X., Shah S.I., Kendall E.W., Sorensen D.L., Sims R.C., Engzike M.C. (1994) Grass-enhanced bioremediation for clay soils contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons. P. 28-42. In Anderson T.A., Coats J.R. (ed.) *Bioremediation through rhizosphere technology*, American chemical Society, Washington DC.
- Raber, B., Kogelknaber, I., Stein, C., and Klem, D. (1998) Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons to dissolved organic matter from different soils. *Chemosphere* 36, 79-97.
- Reilley K.A., Banks M.K., Schwab A.P. (1996) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25, 212-219.
- Richnow H.H., Eschenbach A., Mahro B., Seifert R., Wehrung P., Albrecht P., Michaelis W. (1998) The use of ¹³C-labeled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere* 36, 2221-2224.
- Rijnaarts H.H.M., Bachmann A., Jumelet J.C., Zehnder A.J.B. (1990) Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of a-hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Technol.* 24, 1349-1354.
- Ripp S., Nivens D.E., Ahn Y., Werner C., Jarrell J., Easter J.P., Cox C.D., Burlage R.S., Sayler G.S. 2000. Controlled field release of a bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. *Environ. Sci. Technol.* 34, 846-853.
- Ritter W.F., Scarborough R.W. (1995) A review of bioremediation of contaminated soils and groundwater. *J. Environ. Sci. Health.* 30, 333-357.
- Schwab A.P., Banks M.K. (1994) Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. P. 132-141. In Anderson T.A., Coats J.R. (ed.)

- Bioremediation through rhizosphere technology, American Chemical Society, Washington DC.
- Schilling G., Gransee A., Deubel A., Lezovic G., Ruppel S. (1998) Phosphorus availability, root exsudates and microbial activity in the rhizosphere. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk* 161 ; 465-478.
- Schuttleworth K.L., Cerniglia C.E. (1995) Environmental aspects of PAH biodegradation. *Applied. Biochem. and Biotechnol.* 54, 291-302.
- Scow, K.M., Alexander, M., (1992) Effect of diffusion and sorption on the kinetics of biodegradation: experimental results with synthetic aggregates. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56, 128-134.
- Scow K.M., Johnson C.R. (1997) Effect of sorption on biodegradation of soil pollutants. *Advances in Agronomy.* 58, 1-56.
- Shiaris M.P. (1989) Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo(a)pyrene in surficial estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1391-1399
- Sims, R.C., Doucette, W.J., McLean, J.E., Greneey, W.J., Dupont, R.R., (1988) Treatment potential for 56 EPA-listed hazardous chemicals in soil. EPA/600/6-88/001. Robert Kerr Environmental Research laboratory, Ada, OK, USA.
- Song H.G., Bartha R. (1990) Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 646-651.
- Stella C.M., Groenevelt P.H., Voroney R.P. (1990) Biodegradation of gas oil applied to aggregates of different sizes. *J. Environ. Qual.* 19, 257-260.
- Steer J., Harris J.A. (2000) Shifts in the microbial community in rhizosphere and non-rhizosphere soils during the growth of *Agrostis stolonifera*. *Soil Biology Biochem.* 32, 869-878.
- Steinberg S.M., Pignatello J.J., Sawhney B.L. (1987) Persistence of 1,2-dibromoethane in soils: Entrapment in intraparticle micropores. *Environ. Sci. Technol.* 21, 1201-1208.
- Stringfellow W.T., Aitken M.D. (1994) Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonas isolated from a creosote-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 40,432-438.
- Tang W.C., White J.C., Alexander M. (1998) Utilization of sorbed compounds by microorganisms specifically isolated for that purpose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 117-121.
- Thiem A., Fritzsche C. (1995) Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Mycobacterium sp.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 964-968.
- Thompson I.P., Bailey M.J., Ellis R.J., Maguire N., Meharg A.A. (1999) Response of soil microbial communities to single and multiple doses of an organic pollutant. *Soil. Biol. Biochem.* 31, 95-105.

- Tremolda P., Burnett V., Calamari D., Jones K.C. (1996) Sapatial distribution of PAHs in the UK atmosphere using pine needles. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3570-3577.
- Trzesicka-Mlynarz D., Ward O.P. (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.* 41, 470-476.
- van Brummelen T.C., Verweij R.A., Wedzinga S.A., Van Gestel C.A.M. (1996) Enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons in forest soils near a blast furnace plant. *Chemosphere.* 32, 293-314.
- Villemin G., & Toutain F (1987) Méthode de fixation d'échantillons organo-minéraux de sols pour la microscopie électronique à transmission. In: Fedoroff N, Bresson LM & Courty MA (Eds) *Micromorphology des sols*, (pp 43-48). AFES-AISS Publications
- Walton B.A., Hoylamn A.M., Perez M.M., Anderson T.A., Johnson T.R., Guthrie E.A., Christman R.F. (1994) Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. p. 82-92. In Anderson T.A., Coats J.R. (ed.) *Bioremediation through rhizosphere technology*, American Chemical Society, Washington DC.
- Ward Liebeg E., Cutright T.J. (1999) The investigation of enhanced bioremediation though the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 44, 55-64.
- Weissenfels, W.D., Klewer, H.J., Langhoff, J., (1992) Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 689-696.
- White J.C., Kelsey J.W., Hatzinger P.B., Alexander M. (1997) Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environ. Toxicol. & Chem.* 16, 2040-2045.
- White J.C., Pignatello J.J. (1999) Influence of bisolute competition on the desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4292-4298.
- White J.C., Hunter M., Pignatello J.J., Alexander M. (1999) Increase in bioavailability of aged phenanthrene in soils by competitive displacement with pyrene. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1728-1732.
- Wilcke W., Zech W. and Kobza J. (1996) PAH-pools in soils along a PAH-deposition gradient. *Environ. Pollut.* 92: 307-313.
- Wild S.R., Berrow M.L., Mc Grath S.P., Jones K.C. 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbons in crops from long-term field experiments amended with sewage sludge. *Environ. Pollut.* 76, 25-32.
- Wild S.R., Jones K.C. (1993) Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 5-12.

- Wilson S.C., Jones K.C. (1993) Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) : a review. *Environ. Pollut.* 81, 229-249.
- Wu S., Gschwend P.M. (1988) Numerical modeling of sorption Kinetics of organic compounds to soil and sediment particles. *Wat Resour. Res.* 24, 1373-1383.
- Wrenn B.A., Venosa A.D. (1996) Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42, 252-258.
- Xing, B. (1997) Effect of the quality of soil organic matter on the sorption of naphthalene. *Chemosphere* 35, 633-642.