

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie – Microbiologie

N° d'ordre : 112 / Mag / 2009

N° de série : 007 / SN / 2009

Mémoire

Présenté pour l'obtention du Diplôme de **Magister**

En Microbiologie Appliquée

Option : Biotechnologies Microbiennes

Par : **GUENOUNE Salima**

Thème

**Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine
d'El Harrouch.**

Soutenu le : 10 / 05 / 2009

Devant le jury :

Président : Mr. BOULAHROUF A. Professeur à l'université de Constantine.

Rapporteur : Mr. BOUSSEBOUA H. Professeur à l'université de Constantine.

Examineurs : Mr. RAHMOUNE C. Professeur à l'université de Constantine.

Mr. HAMIDECHI M A. Maître de conférences à l'université de Constantine.

Année Universitaire : 2008-2009

Remerciements

A la fin de ce travail réalisé au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications du Département de Biochimie – Microbiologie de l'Université Mentouri de Constantine, j'aimerais réserver ses lignes en signe de gratitude et de reconnaissance pour tous ceux qui ont apporté une contribution scientifique, logistique ou morale à ce modeste travail.

Je tiens d'abord à remercier très sincèrement mon promoteur Monsieur, BOUSSEBOUA H, Professeur à l'Université de Constantine, pour sa patience et disponibilité.

Je souhaite exprimer mes gratitudes à Monsieur BOULAHROUF A, professeur à l'université de Constantine, pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de ce mémoire. Je tiens aussi à remercier vivement Monsieur RAHMOUNE C, professeur à l'université de Constantine et Monsieur HAMIDECHI M A, maître de conférences à l'université de Constantine, pour l'intérêt qu'ils portent à ce travail en acceptant de l'examiner.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur SEHILI T, professeur à l'université de Constantine, à Monsieur AMERI M A, maître de conférences à l'université de Sidi Belabas, et à Monsieur TIGHEZZA A, maître de conférences à l'université King Saud en Arabie Saoudite.

Un grand merci du fond du cœur s'adresse aussi à M^{lle} AOUATI H et à Monsieur IKROUBERKANE K pour l'aide qu'ils m'ont apporté.

Que chacun trouve dans l'accomplissement de ce mémoire l'expression de mes reconnaissances les plus sincères.

Salima GUENOUNE

Dédicace

A mes précieux parents

Auxquels je dois ce que je suis, que Dieu vous protège.

A mes chers Afcène et Kamel

*Auxquels je suis redevable de l'aboutissement de ce
mémoire.*

*Je vous dois tant que jamais je ne pourrais vous
remercier assez.*

Je vous aime.

Salima

Liste des abréviations

API 20 NE : Appareillage et Procédés d'Identification des Non Entérobactéries (galerie biochimique).

COV : Composé Organique Volatile.

HPA : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

K_{OC} : Coefficient de partage carbone organique/eau.

PCB : Polychlorobenzènes.

PIA : Pseudomonas Isolation Agar.

VF : milieu viande foie.

4-AAP : 4-aminoantipyrine.

2-CP : 2-chlorophénol.

Liste des figures

- Figure 1.** Structure chimique des monochlorophénols.
- Figure 2.** Dégradation des monochlorophénols via *mé*ta- clivage.
- Figure 3.** Voies proposées de biodégradation anaérobie du 2-chlorophénol.
- Figure 4.** Réaction au 4-aminoantipyrine.
- Figure 5.** Une API 20 NE.
- Figure 6.** Préparations de la galerie.
- Figure 7.** Inoculation de la galerie et mode de remplissage.
- Figure 8.** Fiche de résultats API 20 NE.
- Figure 9.** Technique de culture pour l'étude de la morphologie en microscopie optique.
- Figure 10.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-9}).
- Figure 11.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-8}).
- Figure 12.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-7}).
- Figure 13.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-6}).
- Figure 14.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-5}).
- Figure 15.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-4}).
- Figure 16.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-3}).
- Figure 17.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-2}).
- Figure 18.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-1}).
- Figure 19.** Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (SM).
- Figure 20.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-9}).
- Figure 21.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-8}).
- Figure 22.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-7}).
- Figure 23.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-6}).
- Figure 24.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-5}).
- Figure 25.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-4}).
- Figure 26.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-3}).
- Figure 27.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-2}).
- Figure 28.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-1}).
- Figure 29.** Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (SM).
- Figure 30.** Cinétique de la dégradation abiotique du 2-chlorophénol.
- Figure 31.** Cinétique de la dégradation abiotique du 3-chlorophénol.

Figure 32. Libération de chlore au cours de la dégradation du 3chlorophenol.

Figure 33. Libération de chlore au cours de la dégradation du 3chlorophenol.

Figure 34. Aspect macroscopique (souche A₁).

Figure 35 (a et b). Aspect microscopique (souche A₁).

Figure 36. Aspect macroscopique de la souche A₂.

Figure 37. Aspect microscopique de la souche A₂.

Liste des tableaux

Tableau 1. Composés organiques xénobiotiques susceptibles d'être apportés aux sols.

Tableau 2. Principales techniques de décontamination par des microorganismes.

Tableau 3. Microorganismes aérobies pouvant utiliser les monochlorophénols comme seule source de carbone et d'énergie.

Tableau 4. Les vitesses instantanées de la dégradation du 2-chlorophénol (mg/L*h).

Tableau 5. Les vitesses instantanées de la dégradation du 3-chlorophénol (mg/L*h).

Tableau 6. Les pourcentages de dégradation du 2-chlorophénol (%).

Tableau 7. Les pourcentages de dégradation du 3-chlorophénol (%).

Tableau 8. Tableau de lecture (API 20 NE).

Tableau 9. Cinétique de dégradation du 2-chlorophénol (mg/L).

Tableau 10. Cinétique de dégradation du 3-chlorophénol (mg/L).

Tableau 11. Différentiel de chlore libéré au cours de la dégradation du 2-chlorophénol.

Tableau 12. Différentiel de chlore libéré au cours de la dégradation du 3-chlorophénol.

Tableau 13. Effet de la dilution de l'inoculum sur la biodégradation du 2-CP (ANOVA).

Tableau 14. Effet de la dilution de l'inoculum sur la biodégradation du 3-CP (ANOVA).

Tableau 15. Comparaison entre la dégradation biologique et abiotique du 2-CP (test student).

Tableau 16. Comparaison entre la dégradation biologique et abiotique du 3-CP (test student).

Tableau 17. Variation du pH au cours de la dégradation du 2-chlorophénol.

Tableau 18. Variation du pH au cours de la dégradation du 3-chlorophénol.

Tableau 19. Résultats d'identification des espèces bactériennes sur galerie API 20 NE.

Introduction

Revue bibliographique

Le sol	2
1. Définition	2
2. Composition	2
2.1. La phase solide du sol	2
2.2. La phase liquide du sol.....	2
2.3. La phase gazeuse du sol.....	3
2.4. Les microorganismes du sol.....	3
2.4.1 Les procaryotes.....	3
2.4.2 Les Eucaryotes	3
3. Contamination des sols.....	4
3.1. Contamination biologique.....	4
3.2. Contaminations par les métaux lourds	4
3.3. Contamination par les composés organiques	6
3.3.1. Composés organiques naturels	6
3.3.2. Les xénobiotiques.....	6
3.3.2.1. La mobilité	7
3.3.2.2. Rétention de composés organiques xénobiotiques.....	7
3.3.2.3. Dégradation des composés organiques xénobiotiques	11
3.3.2.4. Biodisponibilité dans le sol	11
3.3.2.5. La bioaccumulation	11
4. Décontamination des sols.....	11
4.1. Méthodes de dépollution	12
4.1.1. Dépollution par remplacement	12
4.1.2. Dépollution physico-chimique	12
4.1.3. Dépollution biologique (la bioremédiation)	12
4.1.3.1. Utilisation de plantes (la phytoremédiation)	14
4.1.3.1. Utilisation des microorganismes	14
Les monochlorophénols	15
1. Définition	15
2. Les monochlorophénols	15
2.1. Propriétés physico-chimiques	16
2.2. Utilisation et source de contamination.....	16
2.3. Toxicité	17

2.4. Volatilisation.....	17
2.5. Sorption.....	17
2.6. Dégradation.....	18
2.6.1. La Photodégradation.....	18
2.6.2. Biodégradation des monochlorophénols	20
2.6.2.1. Biodégradation aérobie	20
2.6.2.2. Biodégradation anaérobie.....	22
Matériel et méthodes	
1. Description du sol.....	23
2. Choix des xénobiotiques	23
3. Prélèvement du matériel terreux.....	23
4. Isolement des microorganismes dominants impliqués dans la biodégradation en milieu liquide : méthode de la dilution extinction.....	23
5. Suivi de la biodégradabilité des isomères	23
5.1. Technique de la production de gaz in vitro.....	24
5.1.1. Milieu de culture	24
5.1.2. Préparation de la suspension du sol.....	24
5.1.3. Préparation des dilutions	24
5.1.4. Inoculation.....	24
5.1.5. Incubation, dosages et lectures	26
5.1.6. Témoins et contrôle.....	26
5.2. Suivi de la concentration des isomères par dosage colorimétrique.....	26
5.3. Dosage du chlore libre	27
➤ Préparation des courbes étalons	27
6. Purification et identification des souches.....	28
6.1. Les souches bactériennes	28
6.1.1. Tests préliminaires	28
6.1.1.1. L'examen à l'état frais.....	28
6.1.1.2. Coloration de gram.....	28
6.1.1.3. La mobilité	29
6.1.1.4. Le type respiratoire.....	29
6.1.1.5. Recherche de l'oxydase.....	29
6.1.1.6. Ensemencement sur milieu PIA	29
6.1.1.7. King A	29
6.1.1.8. King B	29
6.1.2. API 20 NE	31

6.1.2.1. Préparation de la galerie	31
6.1.2.2. Préparation de l'inoculum	31
6.1.2.3. Inoculation de la galerie	31
6.1.2.4. Lecture et interprétation	33
6.1.2.4.1. Test NO ₃	33
6.1.2.4.2. Test TRP	33
6.1.2.4.3. Test d'assimilation	33
6.1.2.4.4. Interprétation	33
6.1.2.5. Identification	35
6.2. Les moisissures	35
Résultats et discussion	
Partie biochimique	36
1. Biodégradation de monochlorophénols par la microflore totale du sol	36
1.1. Qualité de l'inoculum.....	36
1.2. Cinétique de la biodégradation.....	36
1.2.1. Modélisation mathématique du processus de la biodégradation	36
1.2.2. Début de la biodégradation.....	41
1.2.3. Vitesses de la biodégradation	43
1.2.4. Taux de la biodégradation	43
1.2.5. La biodégradation à la fin de la cinétique.....	45
2. Témoins et contrôle	48
3. Libération de chlore	51
4. Variataion du pH du milieu	51
5. Production de gaz in vitro	51
Partie microbiologique	52
1. Identification des souches bactériennes	52
1.1. Tests préliminaires	52
1.1.1. L'examen à l'état frais.....	52
1.1.2. Coloration de Gram	52
1.1.3. Type respiratoire.....	52
1.1.4. King A et King B.....	52
1.2. Résultats d'identification sur galerie API 20 NE	53
2. Identification des souches de moisissures	55
2.1. Identification de la souche A ₁	55
2.2. Identification de la souche A ₂	55
Conclusion générale	59
Références	62
Annexes	

Introduction

En raison de leurs propriétés antimicrobiennes à large spectre, les chlorophénols sont utilisés comme agents de préservation pour le bois, les peintures, les fibres végétales et le cuir, de même que comme désinfectants (1). Ils sont en outre utilisés comme herbicides, fongicides et insecticides, ainsi que comme produits intermédiaires dans la production de produits pharmaceutiques et de colorants (2, 3). Leur inhalation ou leur ingestion par l'eau et les aliments conduit à des états de toxicités aiguës et chroniques, dont les manifestations pathologiques vont des atteintes dermatologiques aux cancers les plus redoutables, en passant par des troubles digestifs, respiratoires et rénaux. Les chlorophénols peuvent contaminer le sol et éventuellement les eaux souterraines et de surface (3), par suite de leur utilisation directe en agriculture, accidentelle lors de leur transport et de leur stockage ou même par irrigation des champs avec des eaux polluées (4). La dégradation des polluants organiques naturels et synthétiques dans le sol a lieu par voies microbienne et chimique, plus rarement par voie photochimique.

Le travail entrepris dans ce mémoire a pour objectif : l'évaluation de la biodégradabilité du 2- et du 3-chlorophénol ainsi que l'isolement et l'identification des souches dominantes impliquées dans leur dégradation.

La méthodologie envisagée pour l'évaluation de la biodégradation consiste à suivre les trois paramètres suivants :

- La diminution de la concentration des isomères (substrats) en fonction du temps ;
- La libération de chlore inorganique au cours de la biodégradation ;
- L'éventuelle production des gaz.

L'isolement des souches dominantes, responsables de la biodégradation, est réalisé par la méthode de la dilution extinction suivie par une purification sur milieu solide. L'identification des souches bactériennes est effectuée par le système API-biomérieux, alors que celui des moisissures est réalisé par l'étude des aspects macroscopiques et microscopiques.

Le sol

1. Définition

Le sol, la pédosphère (du grec *pedon*, sol) est la partie supérieure de la lithosphère. Elle comprend la couche extérieure, souvent meuble en surface de terre, et inclut les matières premières et la nappe phréatique. Son épaisseur est de quelques décimètres à quelques mètres, c'est la partie dans laquelle se déroulent les processus vitaux du sol (5).

2. Composition

Les sols sont des milieux poreux composés de quatre compartiments qui sont les trois phases, solide, liquide, gazeuse et les organismes vivants (6).

2.1. La phase solide du sol

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. La fraction minérale solide représente à elle seule 93 à 95 % du poids total du sol. Elle est composée d'éléments de tailles très diverses, provenant de la fragmentation plus ou moins poussée de la roche mère originelle. La matière organique inerte provient de l'activité de tous les organismes présents à la surface ou à l'intérieur du sol. Une partie de cette matière organique est produite par des organismes vivants, le reste est constitué par les débris des végétaux morts, les cadavres d'animaux et les cellules microbiennes lysées. L'essentiel de la matière organique parvenue dans le sol est d'origine végétale (6).

2.2. La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure, c'est une solution dont la composition est complexe et très variable. Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisées et non ionisées. La solution du sol est principalement une solution d'électrolytes, généralement peu concentrée, dont la molarité totale est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} mol L⁻¹. Elle contient également des ions H⁺ et OH⁻ dont les concentrations déterminent la réaction du sol caractérisée par son pH (6).

2.3. La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse occupe les pores du sol (8), elle a une composition voisine de celle de l'air mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps. Elle dépend principalement de deux facteurs, la profondeur dans le sol et l'activité biologique (6).

2.4. Les microorganismes du sol

Les organismes vivants du sol sont variés et nombreux. Un sol contient typiquement 10^9 à 10^{10} microorganismes par gramme de sol (9).

2.4.1 Les procaryotes

Ce type d'organismes réunit les bactéries et les archaéobactéries. La variété des innombrables espèces est si grande (10) que, considérées dans leur ensemble, les bactéries semblent pouvoir prospérer dans les milieux les plus divers. Dans le sol, on rencontre surtout des bactéries mésophiles, préférant des pH neutres ou légèrement alcalins. Des bactéries courantes du cycle du soufre, comme *Thiobacillus thiooxidans*, peuvent cependant supporter des pH très acides. Les bactéries anaérobies peuvent coexister avec des bactéries aérobies dans le même échantillon de sol. On a même montré que des bactéries strictement aérobies et des bactéries strictement anaérobies pouvaient être présentes et actives dans une même particule. La densité du peuplement décroît en générale lorsque la profondeur augmente (8).

2.4.2 Les Eucaryotes

Les Champignons

Leurs exigences thermiques permettent de les considérer dans leur ensemble comme des mésophiles : ils se développent entre 10° et 40° C. Les Champignons supportent généralement bien les pH acides et, dans de telles conditions, sont plus compétitifs que les bactéries pour l'exploitation d'un substrat. On ne doit cependant pas, pour autant, les considérer comme des organismes acidophiles.

En fait, ces organismes semblent pouvoir se développer dans des intervalles de pH environnementaux assez larges. Beaucoup possèdent, d'ailleurs, une gamme d'enzymes capables d'attaquer un même substrat à des pH différents (8).

Les algues

Les formes terrestres, toutes microscopiques, sont particulièrement résistantes à la dessiccation. Les algues peuvent se contenter de faibles intensités lumineuses, ce qui leur permet d'avoir un comportement autotrophe actif à plusieurs millimètres au-dessous de la surface, particulièrement dans les sols riches en particules de quartz translucides. Elles sont, dans cette situation, mieux protégées de la dessiccation (8).

Les protozoaires

Dans le sol, on rencontre des représentants de tous les groupes à forme libre. Les Flagellés et les Rhizopodes sont les plus fréquents. Ils se déplacent dans l'eau retenue dans les micropores et à la surface des microagrégats. Plusieurs espèces de Protozoaires du sol se montrent très ubiquitaires et se retrouvent dans des conditions climatiques très différentes (8).

3. Contamination des sols

3.1. Contamination biologique

La pollution biologique des sols est imputable à des organismes pathogènes ou non, étrangers au milieu et parfois à des organismes génétiquement modifiés (11).

3.2. Contaminations par les métaux lourds

Les métaux lourds sont des métaux ayant une densité supérieure à 5. Certains, tels le fer (Fe), le manganèse (Mn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le cobalt (Co), le zinc (Zn) le molybdène (Mo), sont nécessaires aux êtres vivants en petites quantités (12), ils font partie des oligoéléments. D'autres métaux lourds, tels que le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg), et l'argent (Ag) n'entrent pas dans la composition des êtres vivants. A concentration plus élevée, en revanche, tous présentent une toxicité plus ou moins forte qui dépend des conditions ambiantes (8). Les métaux lourds peuvent se trouver dans l'air, dans l'eau et dans le sol. Le pétrole, le charbon et le bois contiennent tous les éléments chimiques et parmi eux, les métaux lourds, en quantités différentes.

Tableau 1. Composés organiques xénobiotiques susceptibles d’être apportés aux sols (7).

Catégorie de composés	Origine	Intérêt	Risques environnementaux
Pesticides	Principalement : activités agricoles et secondairement urbaines et transport.	Protection des plantes hygiène urbaine et entretien des voies de circulation.	Pollution des eaux, de l’air à moindre degré.
Composés organiques volatiles. (COV)	Industrie.	Solvants, produits détachants.	Pollution de l’air.
Hydrocarbures aromatiques polycycliques. (HAP)	Industrie, déchets urbains.		Pollution des sols de l’air et des eaux.
Poly chlorobenzènes. (PCB)	Industrie, déchets urbains.	Isolants électriques.	Pollution des sols, de l’air et des eaux.
Hydrocarbures aliphatiques.	Industrie.	Carburants.	Pollution des sols, de l’air et des eaux.

Il s'en suit que lors des procédés de combustion, ces métaux lourds et/ou leurs composés parviennent dans l'air et peuvent atteindre le sol directement, où ils sont souvent adsorbés sur les aérosols ou dans les eaux des précipitations (7). Ils peuvent également être ramenés au sol par le traitement des cultures avec certains pesticides, les apports d'engrais, de lisiers et de boues ou de composts (13).

3.3. Contamination par les composés organiques

3.3.1. Composés organiques naturels

En règle générale, ils sont complètement biodégradables, au moins sous certaines conditions favorables. Il faut toutefois les considérer comme des polluants si :

- leur concentration est anormalement élevée et engendre un stress important dans la biocénose du sol, ce qui peut conduire à l'inactivation de mécanismes potentiels de biodégradation, ainsi qu'à la perte des propriétés homéostatiques du sol ;
- leur nature chimique ne permet pas leur dégradation dans les conditions du sol considéré. Par exemple, la décomposition de nombreux hydrocarbures est impossible en conditions d'anoxie (7).

3.3.2. Les xénobiotiques

Le sol peut recevoir de nombreux composés organiques xénobiotiques, possédant des structures chimiques et des propriétés très variées (**Tableau. 1**). Ce sont des composés artificiels, inventés par l'homme et différant fortement, dans leur structure chimique des composés synthétisés par les êtres vivants (14). On peut distinguer entre autres :

- des composés inertes, non dégradables, non toxiques, n'interagissant pas avec des organismes vivants. La plupart des plastiques entrent dans cette catégorie ;
- des composés toxiques, plus ou moins dégradables, qui passent la barrière cellulaire lors de la nutrition de la plante.

Ceux-ci peuvent se concentrer le long des chaînes alimentaires et mener à des dommages physiologiques ou à de graves intoxications, voire la mort (7).

Les composés organiques xénobiotiques présents dans le sol sont distribués dans les phases solide, liquide et gazeuse, selon les caractéristiques des phénomènes de partition concernés. Il en résulte que les eaux superficielles et souterraines peuvent être polluées à des degrés divers en fonction de leur prédominance dans la solution du sol ou sur la phase solide.

Le risque de transfert dans les eaux des composés organiques xénobiotiques dépend de leur **mobilité** qui est plus ou moins limitée par leur **rétenion** et de leur quantité présente dans le sol qui, elle, est déterminée par leur **dégradation**. La rétenion et la dégradation sont deux phénomènes clés du processus de pollution, puisqu'ils déterminent les quantités susceptibles d'être transportées. Ces quantités sont aussi diminuées, mais dans une moindre proportion, par **la volatilisation** et **l'absorption par les plantes**. Cependant, ces deux phénomènes ne participent pas à l'effet protecteur des sols puisqu'ils génèrent des pollutions de l'air et des végétaux (7).

3.3.2.1. La mobilité

Le coefficient de partage carbone organique/eau, noté K_{OC} donne une indication sur la répartition de la molécule entre la phase solide et liquide. Une molécule possédant un K_{OC} peu élevé a peu d'affinité pour le sol. Elle a donc tendance à se retrouver en concentration plus importante dans l'eau du sol et donc à être emportée plus facilement par l'eau. D'autres indicateurs, comme l'hydrosolubilité et le coefficient d'adsorption, peuvent également être utiles pour mesurer la capacité des molécules à se disséminer dans l'environnement (15).

3.3.2.2. Rétenion de composés organiques xénobiotiques

La rétenion des substances xénobiotiques n'a un effet protecteur à l'égard des eaux superficielles, qu'en l'absence d'érosion. Plusieurs phénomènes physico-chimiques et biologiques sont impliqués dans la rétenion des composés organiques xénobiotiques dans les sols (7).

➤ **Phénomènes physico-chimiques**

-**L'adsorption** est principalement due à la matière organique des sols pour les molécules non ionisées et aux substances humiques et aux minéraux argileux pour les molécules ionisées. Elle conduit à une rétention réversible.

-**La stabilisation par réactions chimiques ou piégeage physique** est précédée par l'adsorption et entraîne une rétention généralement irréversible en l'absence de destruction de la matière organique.

➤ **Phénomènes microbiologiques**

Les microorganismes, les champignons en particulier, sont capables de retenir des molécules organiques sous forme non extractible (16). L'état physico-chimique des molécules retenues est encore mal connu ; on suppose qu'une partie est associée aux membranes et qu'une autre est retenue, voire transformée dans le cytoplasme (7).

3.3.2.3. Dégradation des composés organiques xénobiotiques

La dégradation est une transformation chimique des molécules organiques et son stade ultime est la minéralisation. Un composé organique placé dans le sol ou à sa surface subit diverses transformations physico-chimiques ou biologiques qui se déroulent suivant un nombre d'étapes plus ou moins grand. Les transformations non biologiques, celles qui sont d'origine physico-chimique ainsi que la photodécomposition conduisent à un ou deux métabolites et rarement plusieurs. Les transformations biologiques d'origine microbienne conduisent, elle aussi à des métabolites mais se poursuivent le plus souvent jusqu'à la minéralisation (7).

La biodégradation

- **Notions de base**

Les composés organiques sont souvent classés comme biodégradables, persistants, ou récalcitrants.

Le terme biodégradable signifie la transformation biologique d'un composé organique en une autre forme. Ce procédé peut donc convertir un composé inoffensif en composé toxique, changer une substance immédiatement métabolisable en substance difficile à détruire ou altérer la toxicité du composé. Cependant, lorsqu'on dit qu'un composé est biodégradable, cela signifie habituellement qu'il peut être minéralisé. La biodégradation primaire, quant à elle, est utilisée pour indiquer une simple transformation alors que le terme de biodégradation partielle signifie n'importe quelle transformation entre la biodégradation primaire et la minéralisation (17).

- **Mécanisme de la biodégradation**

Les microorganismes peuvent seulement réaliser des activités pour lesquelles ils ont une « programmation » génétique. De plus, ils ne peuvent pas tout faire et l'environnement demeure un facteur déterminant dans la réaction pouvant être effectuée par un organisme apte à le faire. D'abord, un organisme susceptible de dégrader doit être présent, ensuite une opportunité doit exister pour que les enzymes nécessaires soient synthétisées. Enfin, les conditions environnementales doivent être appropriées pour que les réactions enzymatiques s'effectuent à une vitesse significative (17).

- **La biodégradation**

De façon générale, le composé chimique supporte la croissance et sert comme source de carbone et d'énergie aux microorganismes (18). Le succès de ce type de métabolisme dépend entre autre de la capacité du composé à induire la synthèse de l'enzyme requise. On met souvent l'emphase sur la spécificité des enzymes comme catalyseurs. Cependant, il n'est pas rare pour les enzymes de se lier à des substrats contenant des groupements fonctionnels xénobiotiques analogues aux substrats naturels. Cela dépend du degré de similarité de la structure entre le composé xénobiotique et le substrat naturel (19). Si le composé xénobiotique est incapable d'induire l'enzyme nécessaire, alors la biodégradation se produira seulement en présence de l'inducteur naturel. Cela peut sévèrement limiter les applications de la capacité enzymatique. Pour que les microorganismes d'une seule espèce effectuent continuellement la dégradation du composé organique en tant que seule source de carbone et d'énergie, ils doivent être absolument en mesure de soutirer cette énergie. S'ils en sont incapables, ils ne pourront pas maintenir leur intégrité cellulaire causant ainsi la mort éventuelle de la culture.

Dans cette situation, la seule façon pour que les microorganismes puissent dégrader constamment le composé xénobiotique est l'utilisation d'une source additionnelle de carbone, ajoutée au milieu ou l'action d'autres organismes dans une communauté mixte (16).

- **Le cométabolisme**

Le cométabolisme, souvent impliqué dans la dégradation de composés xénobiotiques (20), est défini comme la transformation d'un substrat ne servant pas à la division cellulaire en présence obligatoire d'un substrat de croissance ou d'autres composés assimilables (21). Cet aspect de présence obligatoire d'un substrat pour la croissance a été ajouté pour faire une distinction entre le cométabolisme et la biodégradation (22).

Le cométabolisme résulte du large spectre d'activité des enzymes impliquées qui, en plus de leur fonction normale dans le métabolisme, sont capables de transformer d'autres composés (23). Dans certaines conditions, si ces systèmes enzymatiques sont peu spécifiques, ils pourront fonctionner gratuitement en modifiant d'autres composés qui ne sont pas impliqués dans le métabolisme du microorganisme (24). Le caractère essentiel du cométabolisme, qui peut revêtir des formes multiples, est le caractère fortuit de la réaction qui n'apporte aucun gain identifié, énergétique, nutritionnel (source de carbone ...etc.), ou autre, au microorganisme qui le met en œuvre (25). Ce processus de dégradation est très fréquent et beaucoup de microorganismes peuvent y participer (26). Les champignons sont particulièrement impliqués dans ce type de dégradation, en raison de l'abondance de leur système enzymatique à large spectre d'activité (27).

Les microorganismes exercent d'autres effets vis-à-vis des composés organiques, conduisant à leur transformation dans le milieu :

- **Effet enzymatique :** Les enzymes produites par la microflore sont susceptibles de faciliter des réactions de conjugaison et de condensation des molécules de composés organiques, entre elles ou avec des métabolites ou d'autres composés organiques naturellement présents dans le sol (27,28).
- **Effet non enzymatique :** Les réactions non enzymatiques sont le résultat indirect de processus microbiologiques qui induisent des changements de conditions environnementales telles que le pH et le potentiel redox (20).

3.3.2.4. Biodisponibilité dans le sol

La biodisponibilité d'une substance est un concept qui est formulé pour exprimer son aptitude à être absorbée à un instant donné ; c'est une caractéristique instantanée et elle est déterminée par plusieurs phénomènes successifs de natures physiques, physico-chimiques, biochimiques et abiotiques (29). La biodisponibilité résulte de l'enchaînement de deux étapes :

1. la mobilisation est l'ensemble des phénomènes de toutes natures qui concourent à faire passer une substance dans une phase fluide, liquide ou gazeuse.

L'adsorption, la dissolution, la diffusion moléculaire et les transformations chimiques sont donc impliquées dans le déterminisme de la biodisponibilité. Ils fixent ainsi la composition des phases fluides en l'enrichissant quand ils sont à l'origine d'une mobilisation des substances, et en l'appauvrissant quand ils participent à leur immobilisation.

2. Le transport par convection et diffusion moléculaire des substances dissoutes ou en phase gazeuse vers une membrane d'un organisme vivant. Une substance étant au contact d'une membrane, elle est biodisponible et deux autres étapes se succèdent :

- L'absorption, c'est-à-dire le passage des espèces chimiques à travers une membrane, ce qui les amène à l'intérieur de l'organisme,
- Le transport dans l'organisme vivant.

3.3.2.5. La bioaccumulation

La bioaccumulation est le processus de concentration de certaines substances dans l'organisme des êtres vivants. Elle apparaît si le taux d'excrétion est moins élevé que le taux de prise. Ce phénomène se rencontre à tous les niveaux de la chaîne trophique. De ce fait, les teneurs observées dans les tissus des différentes espèces augmentent au fur et à mesure que l'on progresse dans la chaîne alimentaire et on parle alors d'une bioamplification (5).

4. Décontamination des sols

La dépollution des sols ou décontamination des sols consiste principalement à rendre le sol et le sous-sol d'une zone aptes à un nouvel usage industriel ou un usage résidentiel, voire dans les cas extrêmes aptes à un retour à la nature ou à un usage agricole, après sa pollution par une activité ou un accident industriel (30).

4.1. Méthodes de dépollution

Elles peuvent se classer en trois catégories : **hors-site**, **sur-site** et *in-situ*. Les deux premières nécessitent en général l'excavation de la terre à traiter, la dernière se fait par des procédés dits biologiques. Un dernier type d'action existe : **le confinement**. Cependant, il ne constitue pas à proprement parler une action de dépollution, car il consiste à mettre en place une barrière étanche empêchant les transferts entre la source de pollution et le milieu environnant. Cette méthode est utilisée lorsque les autres sont inopérantes, dans l'attente de trouver une technologie adaptée pour mener à bien un véritable traitement du site.

4.1.1. Dépollution par remplacement

Historiquement, il s'agit de la première méthode employée : on décape le sol contaminé sur toute l'épaisseur polluée et on remplace la terre enlevée par de la terre saine prélevée ailleurs. La terre souillée est considérée comme un déchet industriel à partir du moment où elle est déplacée.

4.1.2. Dépollution physico-chimique

L'injection dans le terrain d'un liquide ou d'un gaz sous pression susceptibles de dissoudre le ou les polluants peut être utilisée lorsque ces derniers sont connus. On peut alors retraiter sur place, de manière progressive, les terres souillées. Ceci suppose une installation industrielle temporaire de retraitement pour :

- l'extraction de la terre à traiter (optionnelle selon les méthodes),
- le processus de percolation ou d'injection de gaz,
- la récupération des lixiviats et leur retraitement,
- la remise en place de la terre traitée (si elle a été excavée).

4.1.3. Dépollution biologique (la bioremédiation)

Toutes les techniques basées sur des méthodes physico-chimiques nécessitent du personnel spécialisé et des équipements spécifiques. Ces procédés sont donc très coûteux et ne peuvent s'appliquer qu'à de petites zones où la pression de réutilisation est très forte (31).

Tableau 2. Principales techniques de décontamination par des microorganismes.

	Technique	Principe	Polluant
<i>in situ</i>	Biodégradation	Utilisation de la capacité de certains microorganismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie).	Hydrocarbures pétroliers, (HAP, BTEX, solvants industriels, métaux lourds.
	Bio-immobilisation	Utilisation de la capacité de certains microorganismes à immobiliser un ou plusieurs composants présents à l'état soluble (bactéries).	Métaux et produits pétroliers.
	Biolixiviation	Solubilisation et entraînement dans la phase aqueuse par les microorganismes de polluants fixés ou piégés dans le sol.	Minerais, métaux lourds (Cu, Cr, Fe, Pb, Zn, Co), phosphore.
<i>in situ</i> et hors site	Biorestauration	Ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des microorganismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants.	pollution organique (hydrocarbures pétroliers, HAP), métaux lourds.
	Bio-augmentation	introduction dans le sol de microorganismes exogènes adaptés aux polluants à traiter.	hydrocarbures lourds, HAP, PCB.
	Bio-stimulation	Réensemencement de populations prélevées sur le site, dont la croissance a été stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur site.	Hydrocarbures pétroliers, HAP.
Hors site	Traitement en bioréacteur	Création d'une boue épaisse en mettant la partie fine du sol dans l'eau et ajout de nutriments pour stimuler la croissance de la population microbienne. Un système d'aération est employé pour les procédés aérobies. En fin de traitement, les phases solides et liquides sont séparées et le sol est remis en place.	Hydrocarbures, phénols, HAP, pétrole, PCB, pentachlorophénol, composés organiques halogénés volatils ou semi volatils.

De plus, dans la plupart des cas ces méthodes ont un effet néfaste sur l'activité biologique et la fertilité des sols. C'est pourquoi les voies de décontamination biologique, qui utilisent le métabolisme et l'activité des organismes vivants, présentent un net avantage sur les méthodes précédentes (32).

4.1.3.1. Utilisation de plantes (la phytoremédiation)

De nombreuses plantes sont capables de fixer dans leurs cellules des métaux lourds, des radionucléides, des composés organiques polluants et d'autres produits indésirables (33). Certaines plantes produisent des enzymes qui dégradent ces polluants en des produits moins toxiques ou non toxiques. Elles peuvent également être accompagnées d'une mycorrhizosphère se chargeant du travail de fixation et/ou de transformation (34). L'un des avantages de la phytoremédiation est la possible revalorisation des polluants recyclables. Ainsi, les plantes dites hyperaccumulatrices, qui stockent le polluant dans leurs tiges et leurs feuilles, peuvent être récoltées puis incinérées en vue de récupérer les métaux parmi les cendres et les réutiliser en métallurgie.

4.1.3.2. Utilisation des microorganismes

Certaines bactéries ont le pouvoir de dégrader des molécules complexes et d'en tirer ainsi l'énergie dont elles ont besoin pour vivre. On les a utilisées pendant des années pour traiter des sols pollués par des solvants chlorés. Mais on s'est aperçu que cette technique de traitement microbiologique par dégradation biologique de certains polluants *in-situ*, (éventuellement encouragée par la maîtrise de paramètres comme l'oxygénation, le degré d'hygrométrie, la température) peut générer des produits de dégradation (métabolites) plus toxiques et/ou plus mobiles que les produits initiaux. Ces métabolites ne sont pas les mêmes selon que les conditions de l'activité microbienne sont aérobies ou anaérobies. Afin de contrôler la production des métabolites les plus dangereux, on peut passer de l'un à l'autre des modes de biodégradation lorsque c'est opportun. Actuellement, des recherches portent sur la sélection d'espèces adaptées à la dégradation de chaque type de polluant. Ces recherches sont menées conjointement par des laboratoires de recherche et par des éco-industriels. Les principales techniques de décontamination des sols utilisant des microorganismes sont représentées dans le **Tableau 2 (35)**.

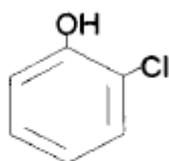
Les monochlorophénols

1. Définition

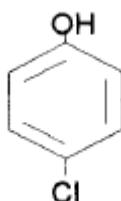
Les chlorophénols sont des composés organiques dans lesquels un ou plusieurs atomes d'hydrogène du noyau phénolique (1-hydroxybenzène) sont remplacés par un ou plusieurs atomes de chlore. On compte 19 molécules de chlorophénols (36). Les chlorophénols sont toxiques, résistants aux attaques microbiennes et s'accumulent dans la chaîne alimentaire (37). Ils sont utilisés en agriculture, en industrie et en santé publique depuis 1920 et sont désignés comme polluants majeurs parmi la liste des polluants dangereux (38).

2. Les monochlorophénols

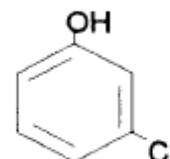
De formule moléculaire brute C_6H_5ClO , ils ont la structure chimique suivante:



2-chlorophénol
(Ortho-chlorophénol)



3-chlorophénol
(méta-chlorophénol)



4-chlorophénol
(Para-chlorophénol)

Figure 1. Structure chimique des monochlorophénols.

2.1. Propriétés physico-chimiques

Le 2-chlorophénol est un liquide incolore à jaune ambre dont le point de fusion se trouve à 9°C, il a une odeur caractéristique ressemblant à celle de l'iodoforme. Le 2-chlorophénol est soluble dans l'eau à raison de 28.5 g/l à 20⁰ C, il se solubilise également dans l'alcool, l'acétone, le benzène, l'hydroxyde de sodium, l'éther et les solutions caustiques alcalines (39). Sa tension de vapeur est de 2,25 mm Hg. Le 2-chlorophénol se forme avec le 4-chlorophénol au cours de la chloration du phénol, les deux isomères sont séparés ensuite par distillation sous vide.

Le 3-chlorophénol est solide à température ambiante, il a une forme cristalline en aiguilles, son point de fusion se trouve à 33°C, sa solubilité dans l'eau est de 26 g/l à 20°C. Sa tension de vapeur est inférieure à 1mm Hg. Le 3-chlorophénol est obtenu à partir du 3-chloroaniline par diazotation suivie par l'ébullition du sel de diazonium.

Le 4-chlorophénol est sous forme de cristaux incolores avec une odeur caractéristique ressemblant à celle du phénol, son point de fusion se trouve à 43,7°C, sa tension de vapeur est de 1mm Hg à 50°C et sa solubilité dans l'eau est modérée. Le 4-chlorophénol est obtenu par la réaction du phénol avec le chlorure sulfate à 25°C.

2.2. Utilisation et source de contamination

Les monochlorophénols sont principalement utilisés comme intermédiaires dans la synthèse des colorants, de la résine phénolique et des chlorophénols les plus chlorés (39). Ils sont connus comme désinfectants et biocides. Ce sont des acides puissants et de plus forts antiseptiques que le phénol. Ils sont aussi utilisés comme solvants pour les fibres de polyester (40). Le 2-chlorophénol est utilisé dans la synthèse de pyrocatechol, il est également utilisé comme solvant pour l'extraction du soufre et de l'azote à partir du charbon (41).

Les monochlorophénols peuvent contaminer l'environnement au cours de leur fabrication, de leur utilisation dans certaines industries (42,43) et à la suite de la décomposition d'autres produits. Le 2-chlorophénol par exemple est produit au cours de la métabolisation du lindane (44). Il est aussi produit avec le 4-chlorophénol suite à la biodégradation du chlorobenzène (45,46). Les monochlorophénols sont formés par la chloration de matières humiques ou d'acides carboxyliques naturels, au cours de la chloration de l'eau potable des réseaux publics de distribution (39,47). Ils sont également formés lors du processus de blanchiment du papier et sont souvent rejetés en l'état dans les effluents (48, 49).

2.3. Toxicité

La toxicité des chlorophénols est déterminée par le nombre et la position de l'atome de chlore, et par leur concentration dans un compartiment (50). Les monochlorophénols sont toxiques par toute voie d'exposition. Le 2-chlorophénol découple la phosphorylation oxydative. Il prévient l'incorporation du phosphate dans la molécule d'ATP sans pour cela affecter le transport d'électrons. Ce qui permet aux cellules de respirer mais a pour résultat l'épuisement de l'ATP (39). Le 2-chlorophénol est aussi connu comme cancérigène (51).

2.4. Volatilisation

Les monochlorophénols sont volatiles. Le 2-chlorophénol présente la pression de vapeur la plus élevée comparativement aux autres chlorophénols, par conséquent, il est probablement le plus évaporé (52). Les demi-vies du 2- et 4-chlorophénols par évaporation depuis une eau de 0,38 cm de profondeur est de 1,35-1,64 et 12,8-17,4 heures respectivement (53). L'extrapolation de ces données indique que l'évaporation du 2-chlorophénol depuis une eau d'1 mètre de profondeur aurait besoin d'approximativement 15 jours. Le taux de volatilisation du 2-chlorophénol d'un sol sableux est trop faible pour pouvoir être mesuré (54).

2.5. Sorption

Généralement, un composé chimique est préférentiellement trouvé dans la phase organique si son $\log K_{ow}$ est > 1 . Le $\log K_{ow}$ de tous les chlorophénols est > 2 . Cela prédit que les chlorophénols ont tendance à se répartir dans les sédiments. Des essais de sorption réalisés au laboratoire avec des sédiments naturels contenant plus de 10 % de matières organiques montrent une forte capacité de sorption dépassant 0,3 mmol/g ou plus de 90 % d'absorption est irréversible (55). Les chlorophénols sont capables de se lier à la matière organique du sol par l'intermédiaire de liaisons covalentes catalysées chimiquement ou biologiquement. Dans un essai de sorption *in batch* la liaison du 4-chlorophénol au sol nécessite l'oxygène et un sol bioactif. L'addition au milieu de peroxyde d'hydrogène provoque une augmentation de la sorption du 4-chlorophénol d'un facteur de 4,4 (56).

2.6. Dégradation

2.6.1. La Photodégradation

Dans l'air, la photodégradation des monochlorophénols se fait simultanément par photolyse directe et par l'attaque des radicaux hydroxyles. Cependant, l'efficacité de la dégradation photolytique est considérablement inférieure à celle due aux radicaux (57).

Dans l'eau, la photodégradation résulte d'une photolyse directe ou bien de la réaction des chlorophénols avec l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) et les radicaux peroxydes (58). Les monochlorophénols exposés à la lumière du soleil (radiation UV) produisent du catéchol et d'autres hydroxybenzène (40). Boule *et al* (59) ont prouvé que l'attaque de l'oxygène et des radicaux hydroxyles sur la position *ortho* du 2-chlorophénol irradié à 254 nm génère un produit instable qui est le 1,2-benzosemiquinone et l'acide chlorhydrique. Ensuite, selon la forme du 2-chlorophénol, le pyrocatechol ou l'acide cyclopentadienyl carboxylique sont formés. Le pyrocatechol résulte de la photodégradation des molécules non dissociées. La photodégradation de la forme anionique du 2-chlorophénol produit l'acide cyclopentadiénique qui se dimérise selon la réaction de Diels-Alder. La présence des groupements C=C=O dans les produits de la photodégradation du 2-chlorophénol par l'UV d'une lampe à mercure dans une matrice d'argon à basse température a été confirmée par Akai *et al.* (60). La demi-vie du 2-chlorophénol dans les eaux naturelles dépend du pH, des saisons de l'année et de la matière organique dissoute, en général la dégradation est plus rapide en été (61).

L'irradiation UV du 3-chlorophénol conduit à la formation du résorcinol et des ions Cl^- (59, 62, 63, 64). Czaplicka (65) a identifié le résorcinol et le 3-chloro-1,4benzenediol dans une solution de 3-chlorophénol irradiée pendant 2 heures à 254 nm.

La photo-oxydation du 4-chlorophénol par l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles conduit à la formation : du benzoquinone, du 2-hydroxy-1,4-benzoquinone, de l'hydroquinone, de dihydroxybiphenylenes, du 2,4-dihydroxy-5-chlorobiphenyl, et du polyhydroxybiphenylenes en petites quantités (66, 67, 68, 69).

Tableau 3. Microorganismes aérobies pouvant utiliser les monochlorophénols comme seule source de carbone et d'énergie (70).

monochlorophénols	Microorganismes
2-chlorophénol	<i>Alcaligenes sp. A7-2</i> , <i>Alcaligenes xylooxidans</i> JH1, <i>Pseudomonas pickettii</i> LD1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1G, <i>Streptomyces rochei</i> 303.
3-chlorophénol	<i>Pseudomonas pickettii</i> LD, <i>Rhodococcus opacus</i> 1G, <i>Alcaligenes xylooxidans</i> JH1.
4-chlorophénol	<i>Azotobacter sp.</i> , <i>Ralstonia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp. B-13</i> , <i>Pseudomonas pickettii</i> LD1, <i>Rhodococcus opacus</i> 1G, <i>Alcaligenes sp. A7-2</i> , <i>Alcaligenes xylooxidans</i> JH1, <i>Arthrobacter ureafaciens</i> CPR706, <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6, <i>Comamonas testosteroni</i> CPW301.

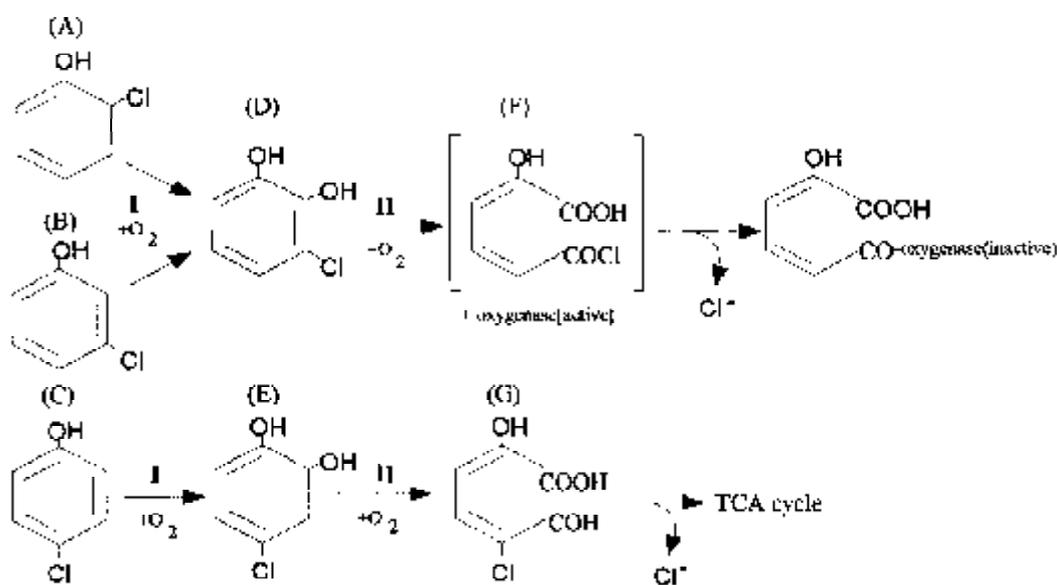


Figure 2. Dégradation des monochlorophénols via *mé*ta- clivage. A, 2-chlorophénol, B, 3-chlorophénol, C, 4-chlorophénol, D, 3-chlorocatéchol, E, 4-chlorocatéchol, F, acide 5-chloroformyl-2-hydroxy-penta-2,4-dienoïque, G, 5-chloro-2-hydroxymuconique semialdéhyde, I, phénol hydroxylase, II, catéchol 2,3-dioxygénase (71).

2.6.2. Biodégradation des monochlorophénols

Plusieurs microorganismes pouvant utiliser les monochlorophénols comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolés (**Tableau. 3**). La présence ou l'absence d'oxygène joue un rôle crucial dans la détermination du mécanisme de biodégradation des composés aromatiques et dans leur devenir dans l'environnement (**72**).

2.6.2.1. Biodégradation aérobie

En aérobiose, l'étape initiale de la dégradation des monochlorophénols est leur transformation en chlorocatéchols. Le métabolisme du 2- et du 3-chlorophénol produit le 3-chlorocatéchol alors que celui du 4-chlorophénol produit le 4-chlorocatéchol (**Figure. 2**). Le 4-chlorocatéchol est aussi produit au cours de la dégradation du 3-chlorophénol (**73**).

Les chlorocatéchols sont des métabolites clés dans la dégradation de plusieurs composés aromatiques (**74**). Après la transformation des chlorophénols en chlorocatéchols, le clivage du cycle aromatique peut avoir lieu. Il existe deux voies de clivage : la voie ortho ou « clivage intradiol du cycle aromatique » et la voie méta ou « clivage extradiol du cycle aromatique ».

Les composés aromatiques naturels tels que le phénol et le benzène, sont typiquement décomposés selon la voie méta alors que les chlorophénols sont généralement dégradés selon le schéma ortho (**74, 75**). Deux types d'ortho-clivage existent : l'ortho-clivage type 1 et l'ortho-clivage type 2 modifié, spécifique à la dégradation des composés aromatiques chlorés, via le chlorocatéchol (**76**). L'ortho-clivage type 2 des composés chloroaromatiques, catalysé par une enzyme : la catéchol 1,2-dioxygénase, est généralement nécessaire pour la minéralisation et la libération de l'atome de chlore. Le méta-clivage par la catéchol 2,3-dioxygénase conduit généralement à une dégradation incomplète due à la production de métabolites qui bloquent la voie de dégradation (**77**). La dégradation successive des chloroaromatiques via le 3-chlorocatéchol par méta-clivage a cependant été démontrée mais elle est très rare (**78**). En général, le méta-clivage du 3-chlorocatéchol provoque l'inactivation de la catéchol 2,3-dioxygénase, soit par le 3-chlorocatéchol lui-même (**79, 75**), soit par la production d'un composé suicide qui se lie irréversiblement à l'enzyme (**80**). Le méta-clivage du 4-chlorocatéchol produit le 5-chloro-2-hydroxymuconique semialdéhyde, connu comme inhibiteur de la voie de dégradation (**81, 82**). Cependant, des rapports plus récents montrent qu'il peut être métabolisé, conduisant alors à la minéralisation du 4-chlorocatéchol (**74, 83**).

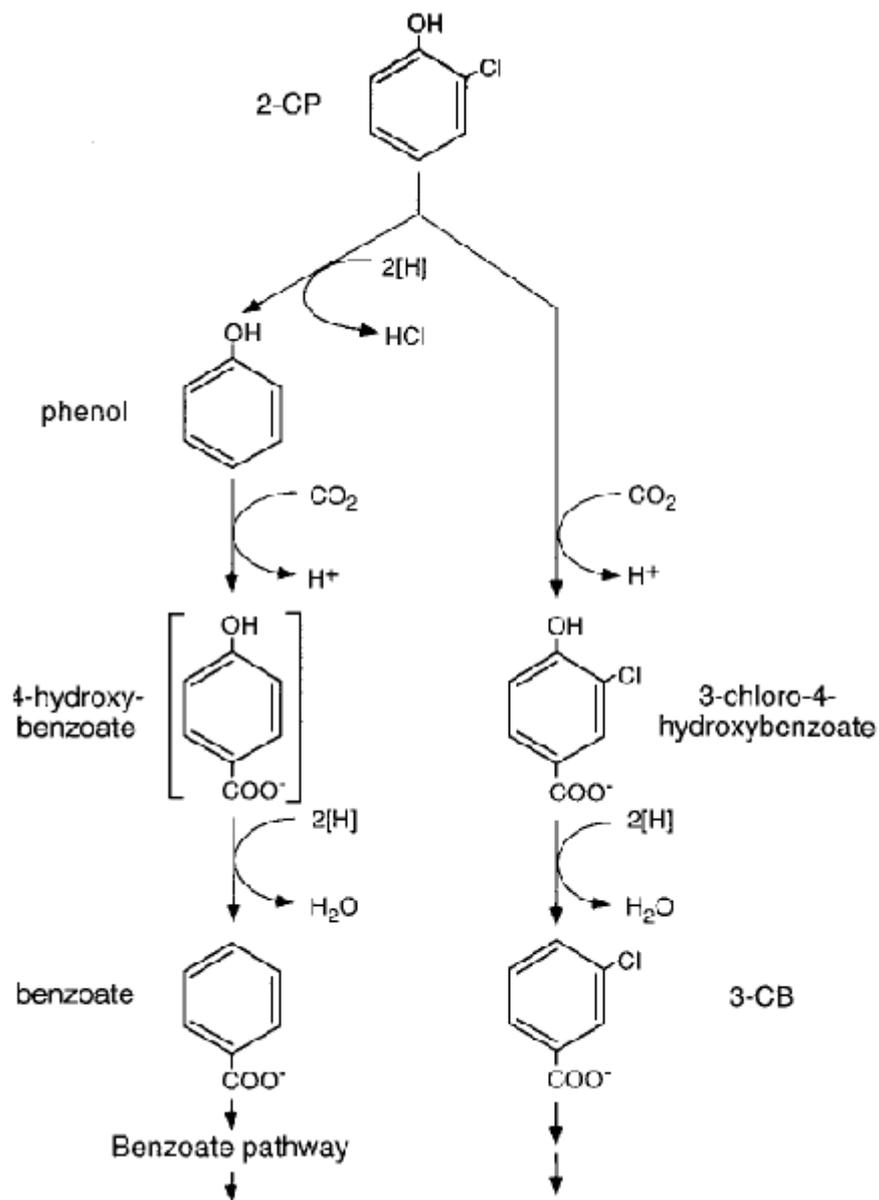


Figure 3. Voies proposées de biodégradation anaérobie du 2-chlorophénol.

2.6.2.2. Biodégradation anaérobie

Plusieurs composés aromatiques chlorés résistent au métabolisme microbien aérobie car l'atome de chlore bloque l'attaque de l'oxygénase (84). Mais, plusieurs composés halogénés peuvent être déshalogénés par des microorganismes anaérobies (85, 86).

En anaérobiose, la biotransformation de la plupart des composés aromatiques halogénés est initiée par une déshalogénéation réductive (87). L'élimination du substituant halogéné s'avère nécessaire avant le clivage du cycle aromatique (88). Ainsi, la biodégradation anaérobie des chlorophénols se fait par déchloration réductive au cours de laquelle l'atome de chlore est remplacé par un hydrogène. Les microorganismes utilisent les chlorophénols comme accepteurs terminaux d'électrons. C'est pour quoi la déchloration réductive est inhibée par la présence d'un autre accepteur d'électrons comme le sulfate, le nitrate, l'O₂ ou le CO₂ (89). La biodégradation anaérobie du 2-chlorophénol par une culture mixte conduit à la formation du phénol (88, 90, 91). L'une des voies de dégradation proposée consiste en une para-carboxylation du phénol en 4-hydroxybenzoate qui, une fois formé, est déshydroxylé en benzoate. Le benzoate subit un clivage du cycle aromatique et finit par être minéralisé (92, 93). Une autre voie possible de dégradation du 2-chlorophénol est initiée par la formation d'un groupement carboxyle analogue à la biotransformation anaérobie des composés aromatiques non halogénés ; une para-oxydation du 2-chlorophénol produit le 3-chloro-4-hydroxybenzène qui, une fois déshydroxylé, produit le 3-chlorobenzoate (88, 93) (Figure. 3).

1. Description du sol

Le sol choisi, à partir duquel on a réalisé l'échantillonnage, est un sol à vocation agricole, situé dans la région d'El Harrouch (Skikda). Il est de nature alluvionnaire et de couleur noire. La couleur noire est due à l'humus et à la présence de composés manganiques et ferriques. La terre est lourde et grasseuse. Elle renferme du calcaire et est légèrement chlorurée (94).

2. Choix des xénobiotiques

Les molécules retenues pour cette étude sont deux isomères de monochlorophénols : **le 2-** et **le 3-chlorophénol**. Les deux isomères sont reconnus par leur toxicité et leur persistance dans le milieu. Les molécules utilisées comme substrats d'étude ont une qualité analytique avec un degré de pureté de **98 %**.

3. Prélèvement du matériel terreux

L'échantillonnage est réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuse. L'échantillon du sol est prélevé de la couche superficielle de la terre ; depuis la surface jusqu'à 10 cm de profondeur, à l'aide d'une spatule stérile, et déposé sur une feuille d'aluminium stérilisée. Après élimination des cailloux, une quantité suffisante de sol est récupérée dans un sachet en papier préalablement stérilisé. Après l'échantillonnage, le matériel terreux est transporté à frais, dans des conditions d'aérobiose au laboratoire ou il est conservé à 4⁰ C jusqu'à utilisation (95).

4. Isolement des microorganismes dominants impliqués dans la biodégradation en milieu liquide : méthode de la dilution extinction

Le principe de la technique repose sur le fait qu'après plusieurs dilutions, seuls les microorganismes dominants persistent dans les dilutions les plus élevées (96).

5. Suivi de la biodégradabilité des isomères

Trois paramètres permettant l'évaluation de la biodégradabilité de nos isomères sont étudiés : L'éventuelle production de gaz, la disparition des substrats en fonction du temps et la libération de chlore dans le milieu.

5.1. Technique de la production de gaz in vitro

Les cultures sont réalisées dans des fermenteurs miniaturisés formant un système clos permettant le piégeage des gaz éventuellement produits par la minéralisation du substrat. Il s'agit de seringues en polypropylène de 60 ml de capacité, liées à des cathéters fermés avec des pinces de Mohr de façon à éviter l'échappement des gaz fermentaires.

5.1.1. Milieu de culture

Le milieu de culture est un milieu minimum dont le monochlorophénol est la seule source de carbone et d'énergie, à raison de **200 mg/L (71)**. La composition du milieu est donnée dans l'**annexe 1**. Le nitrate est utilisé préférentiellement comme source d'azote au lieu de l'ammonium pour éviter la croissance bactérienne et l'acidification du milieu suite à la nitrification (comme le test de biodégradation est effectué sous des conditions d'aérobiose) (**97, 98**). Le pH du milieu est ajusté de telle façon à avoir un pH finale de 6,8 après stérilisation. Le monochlorophénol est ajouté après l'autoclavage du milieu de culture à 120°C pendant 20 minutes.

5.1.2. Préparation de la suspension du sol

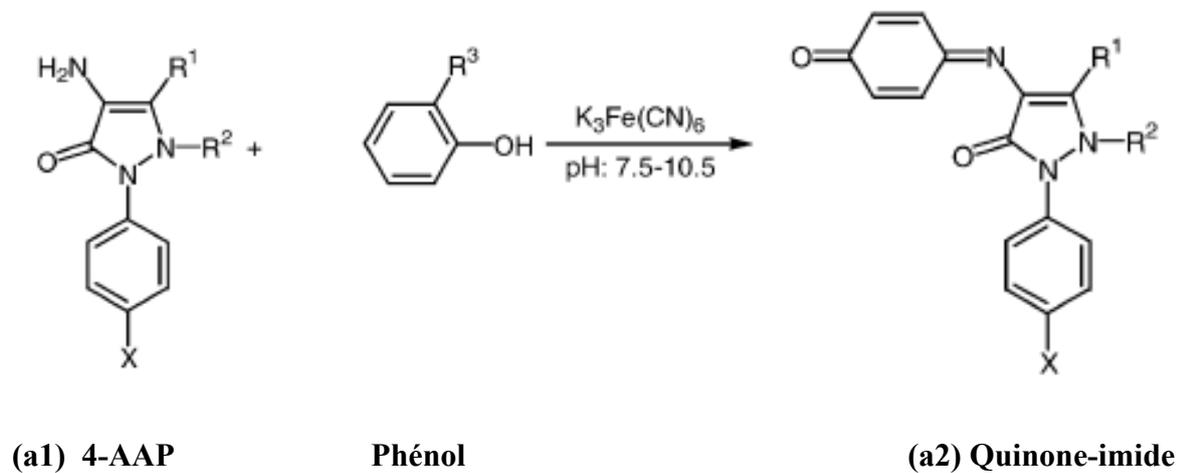
10 g de sol sont homogénéisés dans 95 ml d'une solution saline (0,85 %), préalablement stérilisée, par agitation à 200 rpm pendant 20 minutes à température ambiante (**99**). Cette préparation assure la dispersion des cellules microbiennes. L'opération est faite dans des conditions d'asepsie.

5.1.3. Préparation des dilutions

Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-9}) dans de l'eau physiologique stérile est préparée, de solution en solution, à partir de la suspension du sol (solution mère). Une homogénéisation par au moins 10 secondes d'agitation s'avère nécessaire avant chaque dilution.

5.1.4. Inoculation

18 ml du milieu de culture sont inoculés avec 0,8 ml d'inoculum (la solution mère et ses dilutions). Les seringues sont fermées en gardant le même volume d'air. Trois répétitions sont réalisées pour chaque intervalle de temps et pour chaque dilution.



$R^1 = R^2 = \text{Me}$, $X = \text{H}$

$R^3 = \text{H}$

Figure 4. Réaction au 4-aminoantipyrine.

5.1.5. Incubation, dosages et lectures

Les seringues sont incubées à l'obscurité à une température de 30°C en mode statique (sans agitation). La mesure du pH et le dosage de la molécule sont réalisés au cours des premières heures et des premiers jours (1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème}, 5^{ème}, 7^{ème}). Les concentrations sont aussi mesurées après 14 jours, 1 mois et 2 mois. Le dosage du chlore est effectué à t= 0, 7, 14, 28 et 56 jours (**100**). Le déplacement éventuel des pistons est surveillé durant toute la période d'incubation pour mesurer les gaz éventuellement produits dans les fermenteurs.

5.1.6. Témoins et contrôle

Deux témoins sont réalisés dans les mêmes conditions d'expérience :

- un témoin stérile non inoculé permettant le contrôle de la perte abiotique en monochlorophénols.
- un témoin sans molécule substrat permettant le contrôle des gaz pouvant résulter de l'activité éventuelle de l'inoculum.

5.2. Suivi de la concentration des isomères par dosage colorimétrique

La concentration de monochlorophénols est mesurée par la méthode colorimétrique du 4-aminoantipyrine (**Figure 4 : a1**) développée par Emerson en 1943 (**101**).

Cette méthode est d'usage courant pour la détermination colorimétrique des phénols dans divers matériaux en raison de sa sensibilité, sa rapidité, l'absence d'étapes laborieuses et son coût peu élevé (**102**). Les monochlorophénols réagissent avec le 4-AAP en présence du ferricyanide de potassium comme oxydant dans des conditions alcalines et donnent un complexe coloré (**Figure 4 : a2**) présentant un maximum d'absorbance à 500 nm (**103**).

Le contenu de chaque seringue est centrifugé à 5000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite, le surnageant est dilué à 1/100^{ème} pour ramener les concentrations au niveau de la courbe étalon. 10 ml de l'échantillon à doser sont traités par 0,25 ml du NH₄OH (0,5 N). Le pH est ajusté avec approximativement 200 µL d'un tampon Potassium/Phosphate (pH 6,8). 100 µl de la solution du 4-aminoantipyrine (2 ‰) sont ensuite ajoutés.

Après agitation, 100 µl de potassium ferricyanide (8‰) sont additionnés et les tubes sont agités à nouveau. Après 15 minutes d'incubation, les absorbances sont lues à 500 nm et les concentrations sont calculées à partir des courbes étalons pré-établies selon la loi de Beer-Lambert (104).

5.3. Dosage du chlore libre

Après centrifugation, le chlore inorganique est mesuré par une méthode turbidimétrique. Une solution de nitrate d'argent est préparée de la manière suivante : 4,25 g AgNO₃, 1 ml HNO₃ (65 %), et 0,05 g NaCl sont dissous dans 100 ml d'eau distillée. La solution est ensuite chauffée à 80° C sous agitation, jusqu'à l'apparition d'un précipité de couleur grise. La solution est utilisée après filtration. 1 ml de HNO₃ (2 mol L⁻¹) et 0,5 ml de la solution de nitrate d'argent sont ajoutés à 10 ml de l'échantillon à doser. Après agitation et incubation pendant 5 à 10 minutes à l'obscurité, les densités optiques sont lues à 365 nm (105).

Préparation des courbes étalons

Une solution mère dont la concentration correspond au maximum de la courbe étalon (5mg/ L pour les monochlorophénols et 10 mg/ L pour le chlore inorganique) est utilisée pour confectionner des dilutions de façon à obtenir 10 points expérimentaux régulièrement espacés. Cette méthode présente l'avantage de garder la même incertitude et de ne pas reporter des erreurs d'une solution en une autre. 10 ml de chaque dilution ainsi qu'un témoin (un blanc), où l'échantillon est remplacé par un volume identique d'eau distillée, sont traités de la même façon selon la méthode d'analyse retenue.

La solution mère de NaCl (10 mg/ L en chlorure) est obtenue en diluant au 1/100^{ème} une solution de ce sel à 1g/L en chlorure (1,649 g de NaCl /L) qui a été séché au préalable dans un four à 600° C pendant une heure (106).

6. Purification et identification des souches

Après purification des isolats par plusieurs repiquages successifs, les souches bactériennes sont identifiées par le système API 20 NE. Les souches de moisissures purifiées font l'objet d'une étude des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

6.1. Les souches bactériennes

6.1.1. Tests préliminaires

6.1.1.1. L'examen à l'état frais

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur regroupement **(96)**. L'observation est réalisée comme suit : une petite goutte d'eau distillée stérile est déposée au centre d'une lame stérile. Une partie d'une colonie bactérienne pure est prélevée à l'anse et dissociée dans la goutte. Une lamelle stérile est ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation de bulles d'air. Pour éviter les débordements, quatre gouttes de paraffine stérile sont déposées aux quatre coins de la lamelle, ensuite à l'aide d'une pince stérile bien chauffée chaque goutte est étalée sur la limite entre lame et lamelle (technique du lutage) **(107)**.

6.1.1.2. Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant la division des bactéries en deux groupes distincts ; Gram + et Gram -.

La première étape consiste à réaliser des frottis de la manière suivante : une goutte de suspension bactérienne est déposée sur une lame stérile, la goutte est ensuite étalée sur la lame de façon à obtenir un étalement mince, homogène, de l'ordre de 0,5 à 2 cm². Une fixation par dessiccation est réalisée en chauffant fortement deux à trois fois une demie seconde le frottis tenu à la pince. La coloration est enfin opérée selon le protocole technique décrit dans la référence **(96)**.

6.1.1.3. La mobilité

La mobilité est mise en évidence dans le milieu Mannitol-mobilité ; du fait de la faible teneur en gélose du milieu (gélose mole), les bactéries peuvent ainsi s'y déplacer :

- Les bactéries mobiles troublent le milieu ;
- Les bactéries immobiles persistent près de la piqure centrale.

6.1.1.4. Le type respiratoire

Le type respiratoire est identifié sur une gélose profonde de type VF répartie en tubes en culot de 10 à 15 cm. Après régénération du milieu par chauffage, il est laissé refroidir jusqu'à 45°C puis, ensemencé à l'aide d'une pipette pasteur que l'on plonge au fond du tube et que l'on remonte en décrivant une spirale de façon à ensemencer uniformément le milieu sur toute la hauteur. L'ensemencement est réalisé avec la valeur de 3 à 4 gouttes (**108**).

6.1.1.5. Recherche de l'oxydase

L'oxydase est recherchée par la méthode des disques. A partir d'un milieu solide, une colonie est déposée sur un disque oxydase placé sur une lame, à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée. Une réaction positive est révélée par l'apparition d'une tache violette (**107**).

6.1.1.6. Ensemencement sur milieu PIA

Un ensemencement sur milieu PIA est réalisé, la composition du milieu est donnée dans l'**annexe 1**.

6.1.1.7. King A

Le milieu King A est utilisé pour mettre en évidence la pyocyanine de *Pseudomonas aeruginosa*. Le milieu est ensemencé en stries avec la souche pigmentée, la pyocyanine bleuit le milieu, une coloration rouge traduit la production de pyorubine à partir de la pyocyanine.

6.1.1.8. King B

Le milieu King B est utilisé pour mettre en évidence la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent. Le milieu est ensemencé en stries avec la souche pigmentée, la pyoverdine jaunit le milieu.

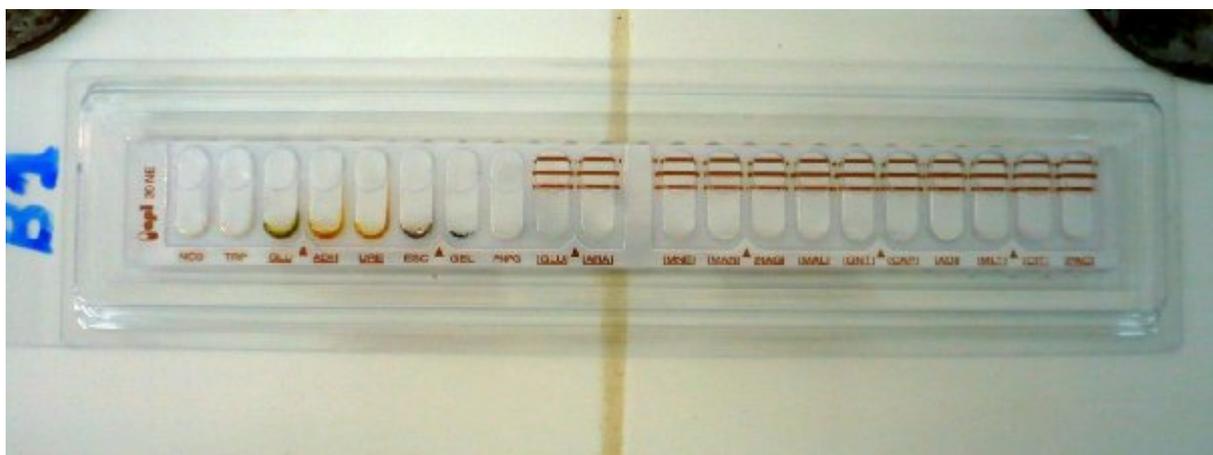


Figure 5. Une API 20 NE.

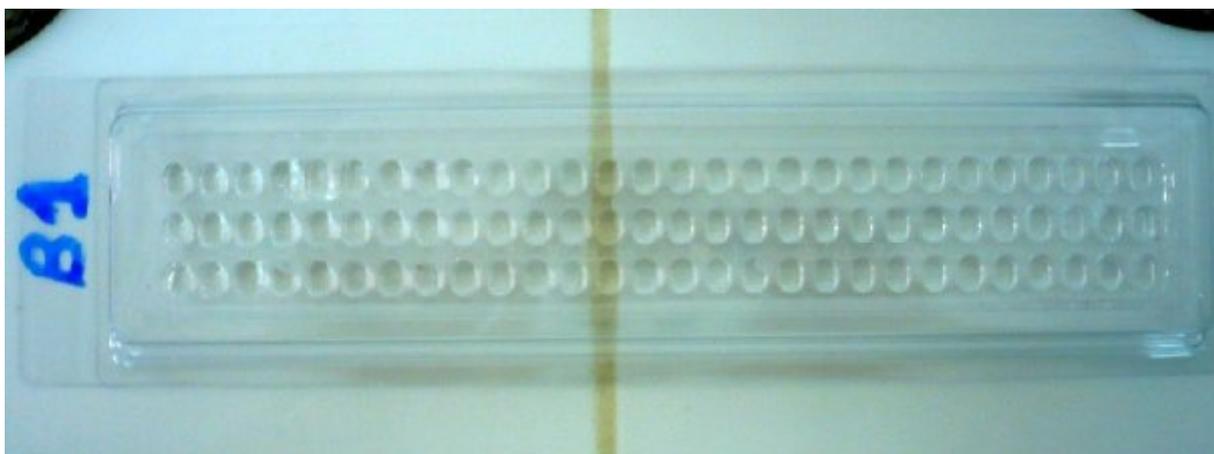


Figure 6. Préparations de la galerie.

6.1.2. API 20 NE

La galerie API 20 NE (**Figure 5**) comporte 20 microcupules contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture des résultats se fait à l'aide du tableau de lecture (**annexe 3**) et l'identification par un logiciel d'identification.

6.1.2.1. Préparation de la galerie

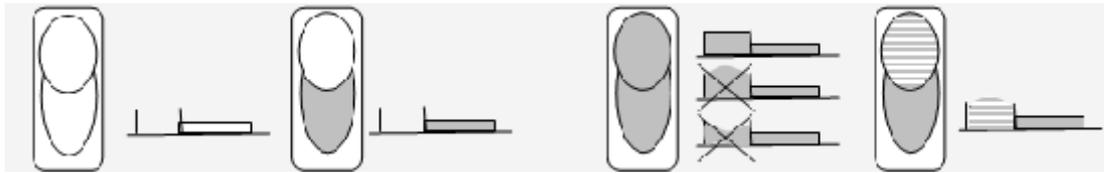
Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation sont réunis, ensuite environ 5 ml d'eau distillée stérile sont répartis dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. La référence de la souche est inscrite sur la languette latérale de la boîte (**Figure 6**).

6.1.2.2. Préparation de l'inoculum

A partir d'une culture jeune (18-24 heures), une à quatre colonies d'aspect morphologique identique sont prélevées par touches successives puis mises en suspension dans une ampoule API contenant du NaCl 0,85 %. Une densité suffisante (0,5 de McFarland) est exigée.

6.1.2.3. Inoculation de la galerie

Les tubes des tests NO₃ à PNG sont remplis en utilisant la pipette ayant servi au prélèvement. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, qui empêcheraient le contact entre les bactéries à identifier et le réactif ou substrat à tester, la pointe de la pipette est posée sur le côté de la cupule tout en inclinant légèrement la boîte d'inoculation vers l'avant. Les tubes et cupules des tests | GLU | à | PAC | sont remplis en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe. Enfin, les cupules des trois tests soulignés (GLU, ADH, URE) sont remplies d'huile de paraffine en formant un ménisque convexe (**Figure 7**). A la fin la boîte d'incubation est fermée et incubée à 30° C pendant 24 heures.

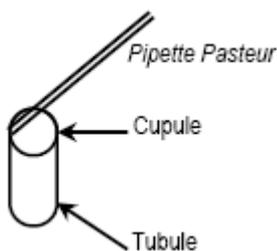


Cupule vide

Remplissage du tube

remplissage tube et cupule.

remplir la partie inférieure puis compléter avec l'huile de paraffine.



Remplir le tube en posant la pipette contre la paroi de la cupule.

Figure 7. Inoculation de la galerie et mode de remplissage.

Figure 8. Fiche de résultats API 20 NE.

6.1.2.4. Lecture et interprétation

Après incubation, la lecture de la galerie est faite en se référant au tableau de lecture. Les résultats de toutes les réactions spontanées (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG) sont notés sur la fiche de résultats (**Figure 8**).

- **Test NO₃**

La révélation des deux tests NO₃ et TRP est faite en mettant les tests d'assimilation à l'abri d'une contamination par l'air. Une goutte de chaque réactif (NIT 1 et NIT 2) est ajoutée dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une couleur rouge indique une réaction positive, à noter sur la fiche des résultats. Une réaction négative peut être due à la production d'azote (éventuellement signalée par la présence de microbulles). Pour cela, 2-3 mg de réactif de Zn sont ajoutés dans la cupule NO₃. Après 5 minutes, une cupule restée incolore indique une réaction positive. Si la cupule devient rose-rouge, la réaction est négative.

- **Test TRP**

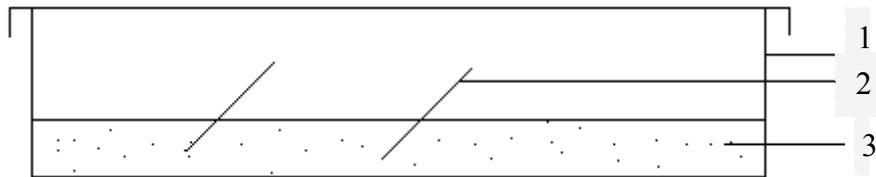
Une goutte de réactif JAMES est ajoutée dans la cupule TRP. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive.

- **Test d'assimilation**

La pousse bactérienne est observée, une cupule trouble indique une réaction positive.

- **Interprétation**

L'identification est obtenue à partir du profil numérique. Sur la fiche des résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur (1, 2, 4) est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21^{ème} test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.



1. Boîte de Pétri.
2. Lamelle.
3. Milieu de cultureensemencé.

Figure 9. Technique de culture pour l'étude de la morphologie en microscopie optique.

6.1.2.5. Identification

L'identification est réalisée à partir de la base de données **API 20 NE V6.0**, à l'aide du logiciel d'identification **apiweb**.

6.2. Les moisissures

Les moisissures isolées font l'objet d'une étude macroscopique et microscopique. L'examen à l'état frais a été réalisé après culture sur milieu sabouraud, deux techniques sont utilisées :

-L'examen sur ruban adhésif

Un ruban adhésif est collé sur la moisissure puis enlevé délicatement et mis sur une goutte de lactophénol, déposée sur une lame et observée directement au microscope optique **(108)**.

-La technique de lamelle

Elle consiste en l'insertion d'une lamelle stérile dans le milieu gélosé, préalablement ensemencé de sorte qu'elle forme avec ce dernier un angle de 45° **(Figure 9)**. Après incubation à 30°C, la lamelle est retirée délicatement puis déposée sur une lame avec une goutte de lactophénol. L'observation au microscope optique est réalisée à différents grossissements **(109)**.

Partie biochimique

1. Biodégradation de monochlorophénols par la microflore totale du sol

1.1. Qualité de l'inoculum

L'inoculum utilisé pour notre étude provient d'une terre agricole qui reçoit différentes charges de polluants, dont des composés chlorés phénoliques. L'inoculum ainsi que ses différentes dilutions ont été utilisés tels qu'ils étaient (sans acclimatation). Par ailleurs, la plupart des travaux de biodégradation étudient la dégradation de chlorophénols par des microorganismes sélectionnés par la méthode d'enrichissement (110). Cette méthode, généralement longue, est plutôt destinée à l'isolement de souches bactériennes d'intérêt pour la dépollution. La biodégradation étudiée ne reflète pas donc celle du milieu naturel pris globalement.

1.2. Cinétique de la biodégradation

1.2.1. Modélisation mathématique du processus de la biodégradation

La présentation des valeurs expérimentales des concentrations du 2 et 3-chlorophénol en fonction du temps, sur un papier à échelle semi-logarithmique, donne un nuage de point qui s'ajuste facilement à une droite d'équation suivante :

$$Y = a - b X \quad \text{où } X = \log x.$$

Notre courbe de régression est donc de type logistique suivant (111) :

$$Y = a + b' \log x + c (\log x)^2 \quad \text{avec } c = 0 \text{ et } b' = -b.$$

Cela donne une courbe de régression logarithmique de la forme suivante :

$$y = a - b \log x \dots [1].$$

L'estimation des constantes **a** et **b** est faite par le logiciel STATISTICA 7. Le logiciel calcule automatiquement la meilleure courbe de régression (Figure 10 à 29) pour ajuster les données au sens des moindres carrés (D minimum) :

$$D = \sum_i D_i^2 \text{ avec } D_i = y_i - z_i.$$

$y_i = f(x_i)$: Courbe expérimentale.

$z_i = f(x_i)$: Courbe de régression.

Les équations de vitesses sont ensuite déduites (dérivées par rapport au temps) de chaque équation de régression et un tableau de vitesses instantanées est établi pour chaque isomère (Tableaux 4 et 5).

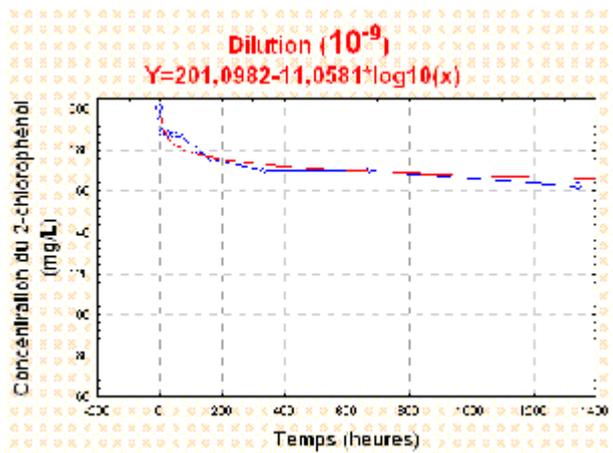


Figure 10. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-9}).

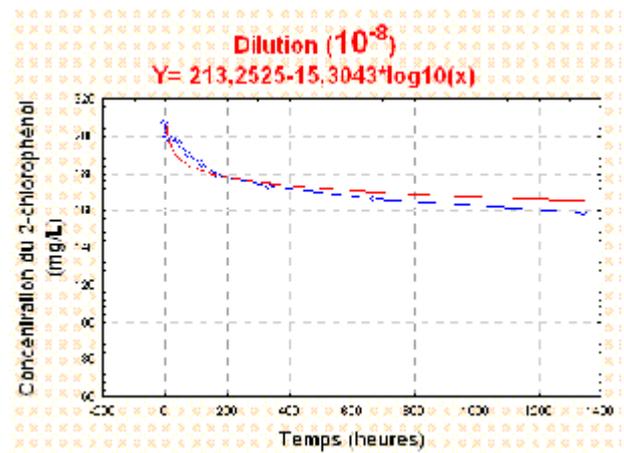


Figure 11. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-8}).

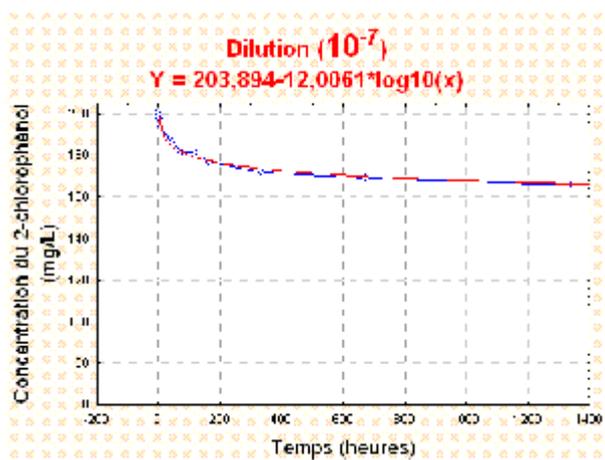


Figure 12. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-7}).

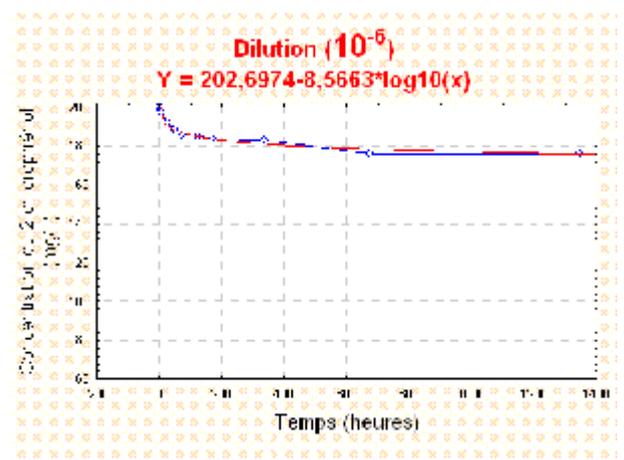


Figure 13. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-6}).

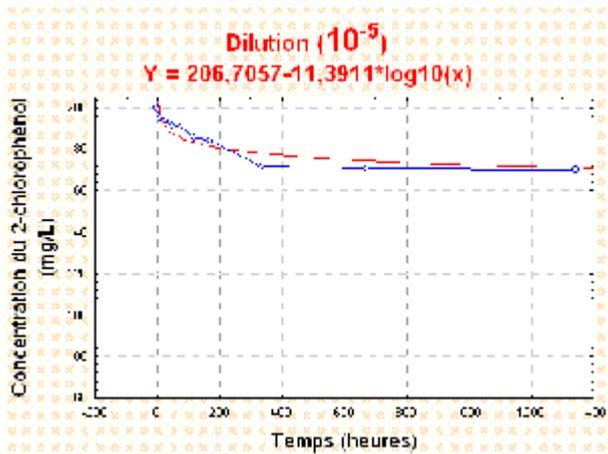


Figure 14. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-5}).

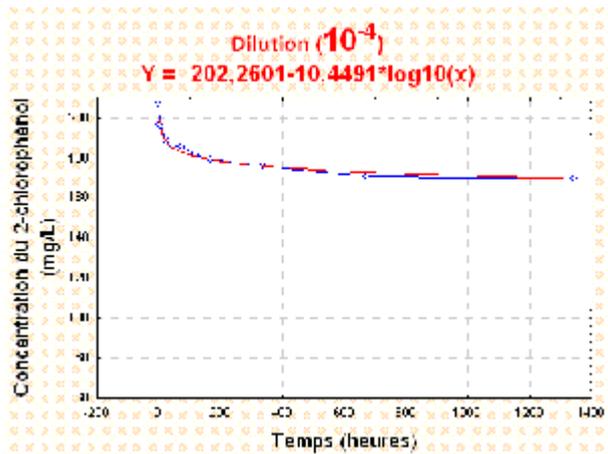


Figure 15. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-4}).

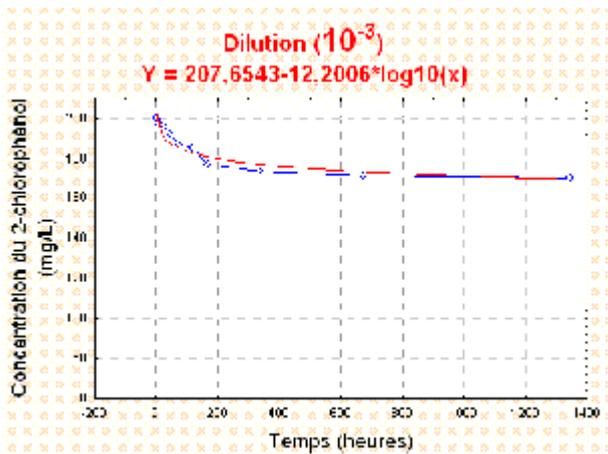


Figure 16. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-3}).

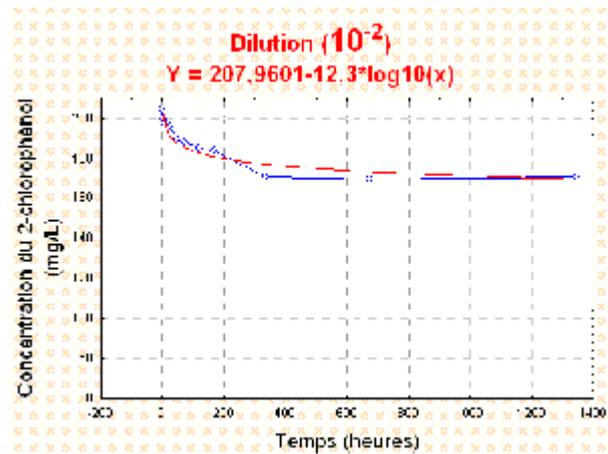


Figure 17. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-2}).

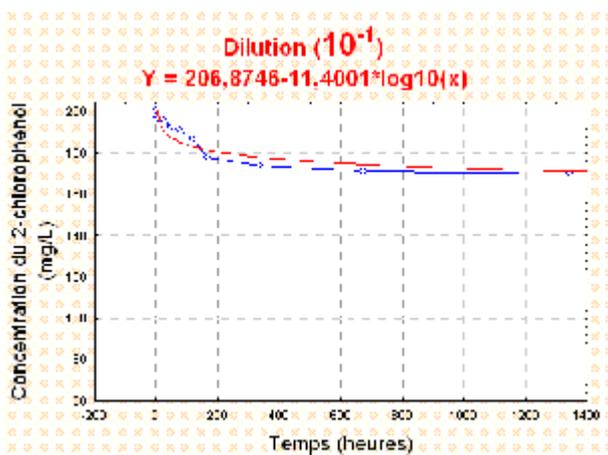


Figure 18. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (10^{-1}).

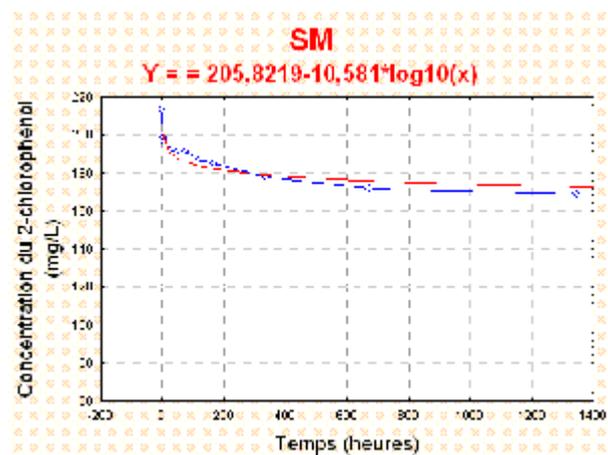


Figure 19. Cinétique de la biodégradation du 2-chlorophénol (SM).

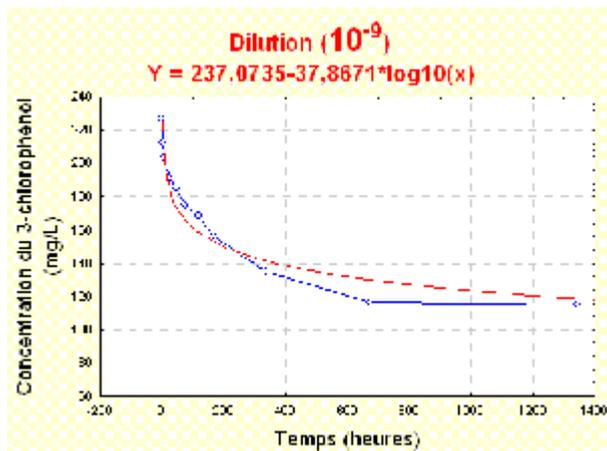


Figure 20. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-9}).

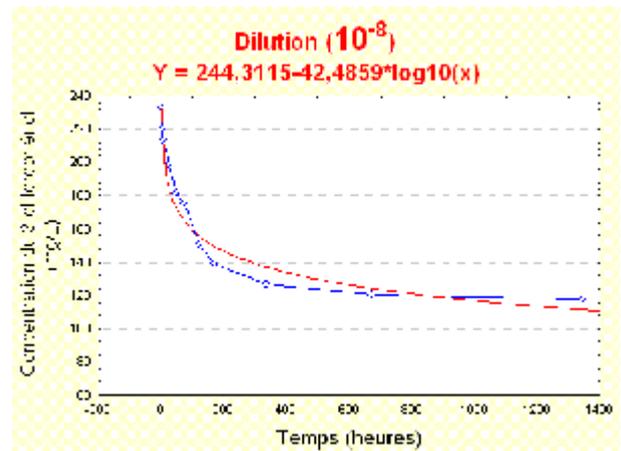


Figure 21. Cinétique de biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-8}).

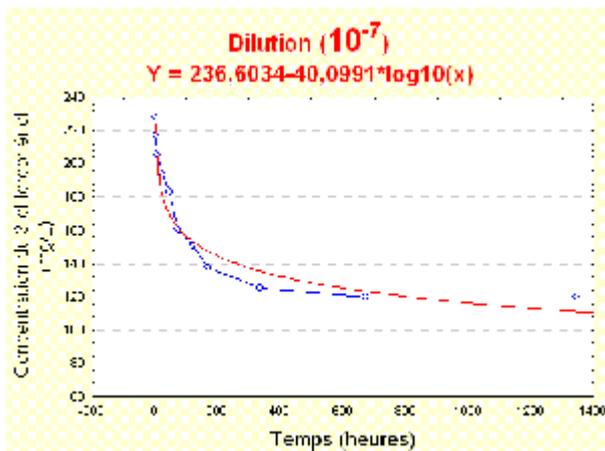


Figure 22. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-7}).

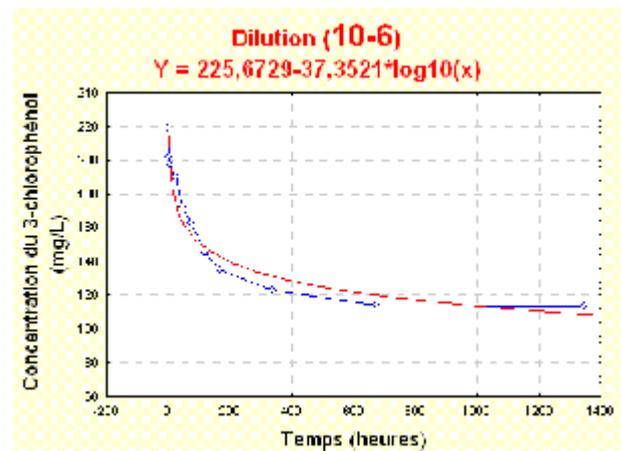


Figure 23. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-6}).

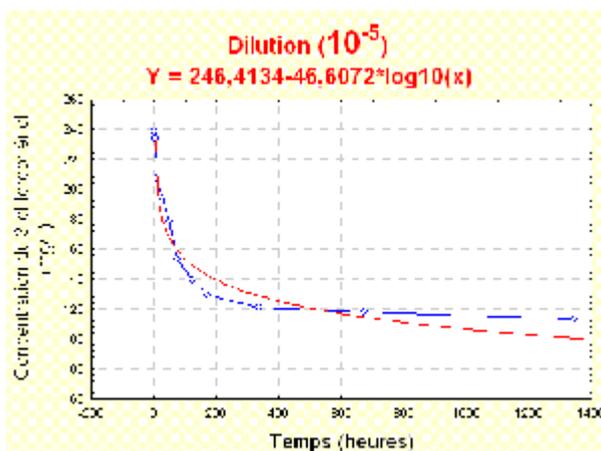


Figure 24. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-5}).

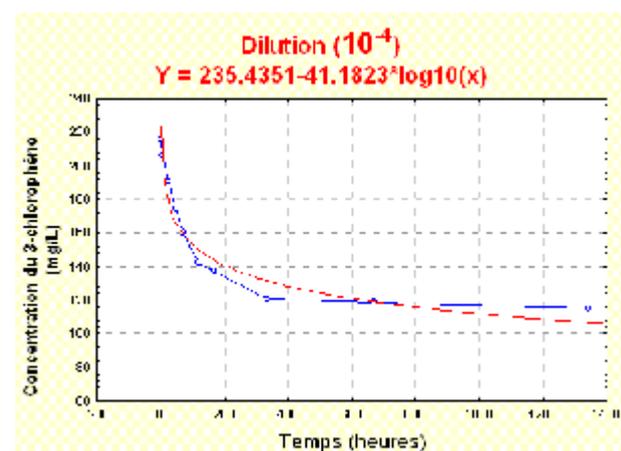


Figure 25. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-4}).

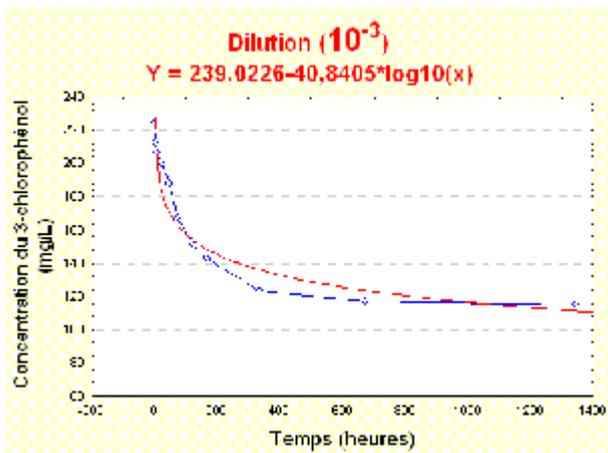


Figure 26. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-3}).

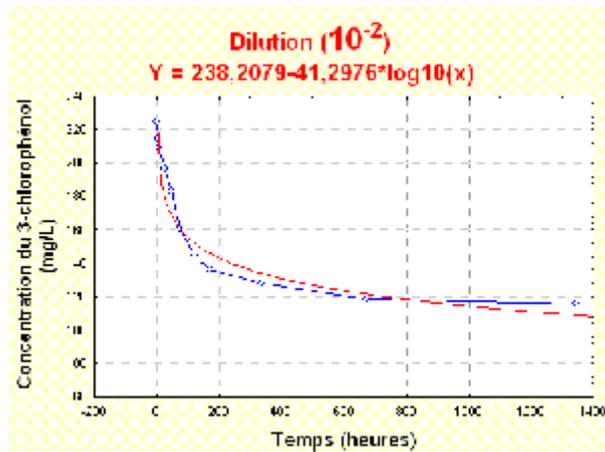


Figure 27. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-2}).

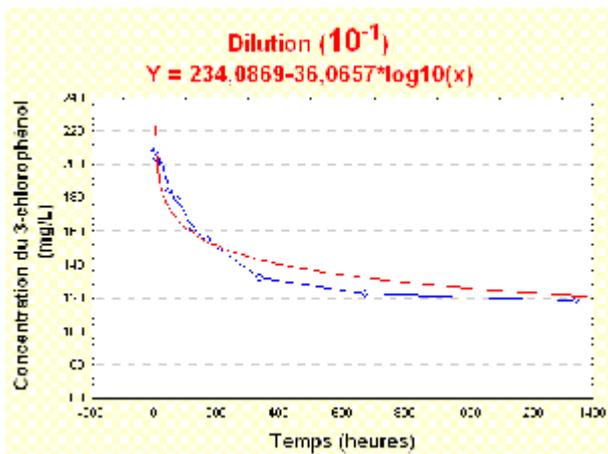


Figure 28. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (10^{-1}).

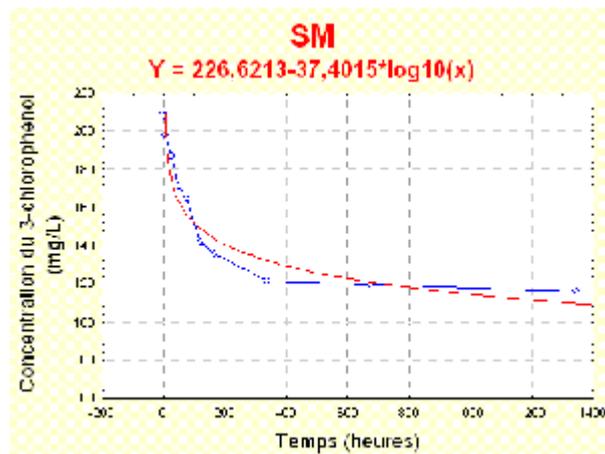


Figure 29. Cinétique de la biodégradation du 3-chlorophénol (SM).

1.2.2 Début de la biodégradation

La biodégradation des deux isomères par la microflore totale du sol commence déjà à $t = 2$ heures (**Figure 10 à 29**). Selon la littérature scientifique, la biodégradation des chlorophénols engendre souvent une phase de latence plus ou moins importante. La phase de latence correspond au temps nécessaire pour synthétiser les enzymes adaptées au nouveau substrat, sa durée est variable en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions plus ou moins favorables du milieu.

Par ailleurs, l'enzyme qui intervient dans la première étape de la biodégradation des chlorophénols est la phénol hydroxylase. Cette dernière est une enzyme intracellulaire, d'une spécificité un peu élargie et qui peut être, de ce fait, induite sur d'autres composés apparentés au phénol (**112**). D'autres enzymes sont aussi capables de prendre ces composés xénobiotiques pour cible. La toluène dioxygénase et la cis-toluène dihydrodiol déshydrogénase, à titre d'exemple, ont une spécificité enzymatique élastique qui leur permet d'oxyder plusieurs composés aromatiques en catéchols. Ainsi les cellules de *Pseudomonas putida* cultivées donc sur le toluène sont capables d'oxyder les monochlorophénols, le 2,4-DCP, le 2,3-DCP, le 2,5-DCP, le 3,4-DCP et le 2,4,5-TCP en chlorocatéchols (**113**).

Le 2- et le 3-chlorophénol sont des dérivés chlorés du phénol ; un xénobiotique et un polluant toxique à faible taux. Or les composés phénoliques naturellement produits existent depuis des temps immémoriaux dans les milieux naturels (**114, 115**). Certains travaux ont montré que les chlorophénols sont aussi naturellement produits par certains microorganismes au niveau du sol (**116, 117**). A ceci s'ajoute l'effet anthropique de l'homme par l'application de nombreux produits phytosanitaires. En effet, le dosage de la suspension du sol par la méthode du 4- AAP a permis de noter une concentration de **0,98-1,59 mg/L** en composés phénoliques intrinsèques, ce qui confirme leur présence dans le milieu d'échantillonnage. Donc, les cellules microbiennes de notre inoculum pourraient avoir déjà dans leur cytoplasme les enzymes nécessaires pour la dégradation, préalablement induites, ce qui leur a permis de commencer si rapidement l'assimilation et la métabolisation des deux isomères. Des essais analogues menés avec des cultures bactériennes pures engendrent d'autres situations : **Goswami et al. (118)** ont enregistré une phase de latence de 5 jours avant le début de la dégradation du 2-chlorophénol par une culture pure de *Rhodococcus erythropolis* M1.

Tableau 4. Les vitesses instantanées de la dégradation du 2-chlorophénol (mg/L.*h).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
2 h	-2,4	-3,323	-2,6071	-1,86	-2,5	-2,265	-2,65	-2,67	-2,5	-2,3	-9
6 h	-0,8	-1,107667	-0,869033	-0,62	-0,833333	-0,755	-0,883333	-0,89	-0,833333	-0,766667	-3
24 h	-0,2	-0,276917	-0,217258	-0,155	-0,208333	-0,18875	-0,220833	-0,2225	-0,208333	-0,191667	-0,75
48 h	-0,1	-0,138458	-0,108629	-0,0775	-0,104167	-0,094375	-0,110417	-0,11125	-0,104167	-0,095833	-0,3746
72 h	-0,066	-0,092306	-0,072419	-0,051667	-0,069444	-0,062917	-0,073611	-0,074167	-0,069444	-0,063889	-0,25
120 h	-0,04	-0,055383	-0,043452	-0,031	-0,041667	-0,03775	-0,044167	-0,0445	-0,041667	-0,038333	-0,15
168 h	-0,028571	-0,03956	-0,031037	-0,022143	-0,029762	-0,026964	-0,031548	-0,031786	-0,029762	-0,027381	-0,10714
336 h	-0,014286	-0,01978	-0,015518	-0,011071	-0,014881	-0,013482	-0,015774	-0,015893	-0,014881	-0,01369	-0,05357
672 h	-0,007143	-0,00989	-0,007759	-0,005536	-0,00744	-0,006741	-0,007887	-0,007946	-0,00744	-0,006845	-0,026785
1344 h	-0,003571	-0,004945	-0,00388	-0,002768	-0,00372	-0,003371	-0,003943	-0,003973	-0,00372	-0,003423	-0,0134

Tableau 5. Les vitesses instantanées de la dégradation du 3-chlorophénol (mg/L.*h).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
2 h	-8,2225	-9,2255	-8,7075	-8,1105	-10,1205	-8,9425	-8,865	-8,965	-7,83	-8,12	-8,689
6 h	-2,740833	-3,075167	-2,9025	-2,7035	-3,3735	-2,980833	-2,955	-2,988333	-2,61	-2,706667	-2,896333
24 h	-0,685208	-0,768792	-0,725625	-0,675875	-0,843375	-0,745208	-0,73875	-0,747083	-0,6525	-0,676667	-0,724083
48 h	-0,342604	-0,384396	-0,362813	-0,337938	-0,421688	-0,372604	-0,369375	-0,373542	-0,32625	-0,338333	-0,362042
72 h	-0,228403	-0,256264	-0,241875	-0,225292	-0,281125	-0,248403	-0,24625	-0,249028	-0,2175	-0,225556	-0,241361
120 h	-0,137042	-0,153758	-0,145125	-0,135175	-0,168675	-0,149042	-0,14775	-0,149417	-0,1305	-0,135333	-0,144817
168 h	-0,097887	-0,109827	-0,103661	-0,096554	-0,120482	-0,106458	-0,105536	-0,106726	-0,093214	-0,096667	-0,10344
336 h	-0,048943	-0,054914	-0,05183	-0,048277	-0,060241	-0,053229	-0,052768	-0,053363	-0,046607	-0,048333	-0,05172
672 h	-0,024472	-0,027457	-0,025915	-0,024138	-0,030121	-0,026615	-0,026384	-0,026682	-0,023304	-0,024167	-0,02586
1344 h	-0,012236	-0,013728	-0,012958	-0,012069	-0,01506	-0,013307	-0,013192	-0,013341	-0,011652	-0,012083	-0,01293

(Dil) Dilution, (Tps) Temps, (h) Heure, (SM) Solution mère.

Cependant, les cellules induites sur le benzoate étaient en mesure de minéraliser la molécule en 48 heures sans présenter aucune phase de latence (118).

1.2.3. Vitesses de la biodégradation

Les tableaux des vitesses instantanées (Tableaux 4 et 5) montrent que la biodégradation du 3-chlorophénol est 3 à 4 fois plus rapide que celle du 2-chlorophénol, selon les différentes dilutions. La différence marquée entre les vitesses de dégradation des deux isomères pourrait être liée à la position du chlore sur le cycle aromatique, selon Finkel'shtein *et al.* (119), cette dernière influence non seulement la vitesse mais également la voie de la biodégradation (119).

Des résultats similaires aux nôtres, notant que la vitesse de la biodégradation des deux isomères de monochlorophénols décroît du 3-chlorophénol en 2-chlorophénol ont été rapportés par plusieurs travaux (120, 121). Le processus de la biodégradation du 2 et 3-chlorophénol décélère en fonction du temps. En effet, la biodégradation commence avec une vitesse moyenne instantanée relativement importante, de l'ordre de 2,5 et 8,71 mg/ L*h en 2 et 3-chlorophénol respectivement à t = 2 heures. Après 7 jours, la vitesse de la biodégradation est réduite d'un facteur de 84. Au-delà des 7 jours, on note que la vitesse est réduite encore de moitié, et ce d'un intervalle de temps à un autre. La décélération constante de la vitesse peut être expliquée probablement par l'effet toxique des produits de dégradation produits au fur et à mesure de l'assimilation du substrat (voir paragraphe 1.2.5). En effet, des travaux ont bien montré que les produits de dégradation de certaines molécules peuvent être plus toxiques que la molécule initiale (122, 123, 124). D'autre part, les cultures effectuées dans un système fermé ne possèdent pas une source renouvelable d'oxygène, ce dernier étant certainement le facteur limitant pour la biodégradation. Son épuisement du milieu influe directement sur la dégradation aérobie des monochlorophénols par le microbiote du sol.

1.2.4. Taux de la biodégradation

Les résultats des tableaux 6 et 7 montrent que le taux de la biodégradation du 2-chlorophénol est faible. Environ 12 à 23 % seulement de la concentration initiale de la molécule sont dégradés par la microflore totale du sol (solution mère et ses dilutions), et ce jusqu'à la fin des 2 mois d'incubation. La majeure partie dégradée du 2-CP est notée durant les 7 premiers jours d'incubation où le taux moyen de dégradation égale 11,37%, soit 65,83% de la biodégradation totale.

Tableau 6. Les pourcentages de dégradation du 2-chlorophénol (%).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
2 h	2,90223	3,717096	1,212635	1,162501	0,39	5,13813	0,22	2,299863	1,683938	7,156247	9,175
6 h	6,237555	4,141356	2,954239	1,4419	2,405	5,351009	1,335	3,415541	1,957951	7,845159	10,92
24 h	6,451613	4,32938	5,978342	4,086215	2,91	9,00866	1,89	4,125073	2,386409	10,22589	25,915
48 h	6,839904	5,703404	6,751834	5,897321	4,315	10,16014	4,045	7,281268	4,080311	10,47896	37,83
72 h	7,203305	8,326102	9,501472	7,429028	4,8	10,34883	6,795	8,16696	4,419091	10,50239	39,16
120 h	10,41916	10,80899	9,566346	7,603652	7,135	12,3228	7,645	9,615385	6,959944	12,4379	43,015
168 h	12,51493	13,51846	11,90179	8,252258	8,035	13,21302	11,695	10,01664	11,42886	13,21586	46,1
336 h	15,17822	16,72934	14,23724	8,78611	14,075	15,08056	13,35	16,62263	13,27222	16,50576	48,765
672 h	15,36738	19,79076	15,52473	12,12393	14,545	17,60608	14,41	17,23429	14,722	19,46762	58,08
1344 h	19,2055	23,41626	17,43101	12,18879	14,85	18,1673	14,935	16,66667	15,11558	20,73296	65,505

Tableau 7. Les pourcentages de dégradation du 3-chlorophénol (%).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
2 h	6,352459	5,489022	4,693878	7,659574	2,046784	2,106246	5,197505	4,658385	0,336323	0,878049	2,443992
6 h	10,31421	8,549568	9,965986	9,641135	13,02794	4,167027	7,8614	6,901311	1,86846	5,940872	6,856755
24 h	15,66393	14,70393	15,32789	13,20993	18,72645	11,47012	10,83299	12,51346	4,059791	10,91205	10,25119
48 h	18,41475	22,02874	19,76408	21,34979	25,18441	19,07646	16,18794	18,60538	11,17578	18,48869	22,51242
72 h	23,03306	24,66826	29,73361	25,67972	35,93788	25,8923	25,29314	28,54686	13,85082	21,44893	27,10903
120 h	25,73374	35,43327	33,99605	33,61716	41,71553	34,12109	32,39848	35,81794	21,98221	32,47908	29,59661
168 h	31,09508	40,47452	39,62939	38,32	45,85159	36,28452	36,2517	39,5147	25,41943	35,32831	31,82946
336 h	40,68639	45,64796	44,9421	43,80488	49,32351	44,03519	44,81281	43,07859	36,48795	42,20908	37,05032
672 h	48,85792	48,33001	47,40408	47,83716	50,41196	44,94572	47,73666	47,31677	40,82003	42,92979	44,12763
1344 h	49,43279	49,37831	47,54803	48,17333	52,59025	46,6442	48,6201	48,68268	42,8867	44,66135	49,3757

(Dil) Dilution, (Tps) Temps, (h) Heure, (SM) Solution mère.

Au-delà, et jusqu'à la fin d'incubation, une dégradation nettement moins importante est enregistrée, elle ne dépasse pas les **5,9%**. Par contre, le taux de la biodégradation du 2^{ème} isomère s'avère relativement meilleure. Près de **42 à 52 %** de la concentration initiale du 3-chlorophénol sont dégradés à la fin des 2 mois de mesure. Cependant, ce taux est encore non satisfaisant vu la longue période de biodégradation. De même que pour son isomère, **77%** de la biodégradation du 3-chlorophénol est effectuée au cours de la première semaine, soit **36,81 %** de la concentration initiale du 3-chlorophénol. Après, et jusqu'à la fin des 2 mois de mesure, la biodégradation suit une cinétique lente, où seulement **11%** de la molécule son dégradés. Le 3-chlorophénol semble être dégradé plus aisément que son isomère.

1.2.5. La biodégradation à la fin de la cinétique

A t égale 2 mois, La biodégradation du 2 et 3-chlorophénol continue mais La biodégradation atteint des vitesses moyennes remarquablement faibles, de l'ordre de **0,0037** et **0,0129 mg/L*h** respectivement, pour l'ensemble des dilutions du 2 et du 3-chlorophénol.

Parallèlement, on note l'apparition dans le milieu d'une coloration marron, qui est rapportée par plusieurs auteurs (**125, 126, 127**) à la suite à la dégradation de composés chloroaromatiques. Cette couleur est probablement le résultat d'une polymérisation par auto-oxydation du 3-chlorocatéchol, qui s'accumule dans le milieu suite à l'effet négatif qu'il exerce sur l'enzyme du méta-clivage. Cependant, le processus abiotique pourrait ne pas être le seul mécanisme de polymérisation en cause. L'activité des peroxydases et des polyphénols oxydases pourrait aussi engendrer la polymérisation du 3-chlorocatéchol (**128**).

Deux mécanismes par lesquels le 3-chlorophénol interfère avec l'activité du 2,3-dioxygénase ont été proposés :

- ❖ Le 3-chlorocatéchol agit comme un agent chélateur en se liant au noyau de fer de l'enzyme, résultant en l'inactivation réversible de l'enzyme et l'accumulation de chlorocatéchols (**129, 130**),
- ❖ Le second mécanisme consiste en la formation de l'acide *5-chloroformyl-2hydroxy-penta-2,4 diénique* (**131**). Cet acide est un composé de suicide pour la réaction, il se lie irréversiblement à l'enzyme avec une libération ultérieure de chlorure et provoque une destruction de l'activité métabolique.

Comme il y a eu une certaine libération de chlore durant la biodégradation du 2- et 3-chlorophénol, on pourrait donc supposer que l'accumulation du 3-chlorocatéchol est probablement due au dernier mécanisme (voir **Figures 32 et 33**).

Notre travail démontre, encore une fois, la persistance des deux isomères, probablement à cause de leur toxicité vis-à-vis des microorganismes de dégradation. A la fin de la cinétique de la biodégradation, **168,2 et 115,53 mg/L** en 2- et 3- chlorophénol, soit un pourcentage de **82,73%** et **52,14%**, respectivement persistent encore dans le milieu.

Le modèle mathématique prédit que le temps nécessaire pour la minéralisation des molécules, dans nos conditions expérimentales, tend vers l'infini. En effet, le temps de la minéralisation

$$Tm = e^{\left(\frac{a \times \ln 10}{b}\right)} \dots [2].$$

Où *a* et *b* sont les constantes de l'équation de régression [1].

1.2.6. Effet de l'inoculum sur la biodégradation

L'analyse statistique de la variance (**annexe 6**) montre qu'il n'existe pas une différence significative dans la biodégradation d'une dilution à une autre et ce pour les deux isomères. Autrement dit, la dilution de l'inoculum n'a aucun effet sur la biodégradation des monochlorophénols. La dilution élimine les types de microorganismes rares. En effet, lorsque la taille de la communauté microbienne diminue considérablement, jusqu'à ce que le nombre d'individus égale approximativement le nombre original d'espèces, toute dilution ultérieure résulte en l'aviissement de la diversité, car chaque individu enlevé du système enlève avec lui une espèce entière de la communauté (**132**). Seuls les microorganismes dominants peuvent donc être présents dans toutes les dilutions, y compris les plus importantes. Vu que l'absence des types de microorganismes rares dans les dilutions les plus élevées n'a pas influencé la biodégradation, on pourrait alors supposer que la biodégradation résulte principalement de l'action des espèces dominantes.

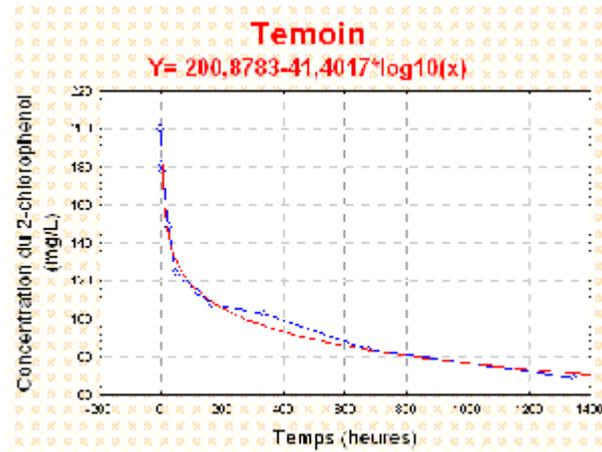


Figure 30. Cinétique de la dégradation abiotique du 2-chlorophénol.

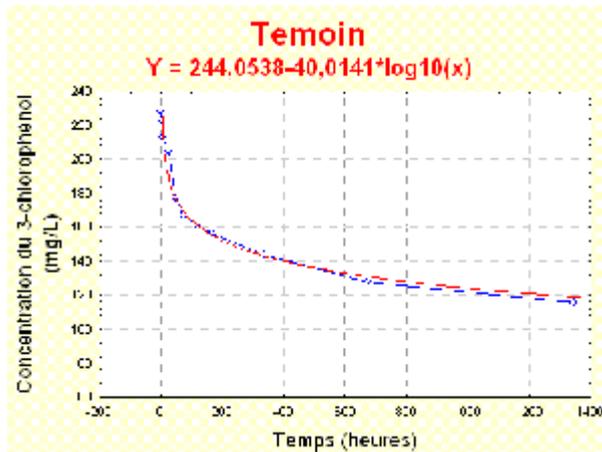


Figure 31. Cinétique de la dégradation abiotique du 3-chlorophénol.

2. Témoins et contrôle

Les témoins sans inoculation montrent une perte abiotique considérablement importante (**Figures 30 et 31**). Environ **65,5 et 49,37 %** en 2- et 3-chlorophénol disparaissent respectivement à la fin des 2 mois de mesure. La perte abiotique est notée dès le premier intervalle de mesure et suit un profil continu jusqu'à la fin des deux mois.

Les chlorophénols peuvent être dégradés par plusieurs processus abiotiques tels que la photolyse, l'hydrolyse ou l'oxydation. La photolyse est la décomposition par la lumière. C'est un phénomène de surface qui n'a de l'ampleur qu'au niveau des eaux peu profondes et des zones ensoleillées (**133**). Au niveau du sol, la lumière peut parfois diffuser jusqu'à 2 cm de profondeur, notamment au niveau des sols riches en particules de quartz translucide (**8**). Dans nos conditions expérimentales, l'incubation des seringues est effectuée dans l'obscurité, l'effet de lumière est par conséquent ôté.

L'oxydation et l'hydrolyse semblent ne pas avoir un effet significatif dans les conditions normales. En effet, la liaison covalente d'un substituant sur un noyau aromatique est résistante à l'hydrolyse en raison de la dense charge négative sur ce dernier. L'obtention du pentachlorophénol à partir de l'hexachlorobenzène, par exemple, nécessite un traitement avec une solution alcaline concentrée à 130-200° C (**133**).

De plus, et de même que pour l'oxydation et l'hydrolyse, la photodégradation des chlorophénols engendre la coupure de la liaison C-Cl et donc la libération de chlore dans le milieu. Or, aucune libération de chlore n'est enregistrée au niveau du témoin stérile, sur toute la période d'incubation (voir résultat **3**). En addition, aucun changement de couleur n'est noté pour ce dernier qui garde toujours sa couleur initiale. Ces résultats signifient que ces processus de dégradation abiotique n'ont probablement pas intervenus. Néanmoins, seule une analyse de la composition des milieux de cultures durant la période de l'essai peut confirmer ou infirmer, avec certitude, nos suppositions.

La volatilisation peut, par contre, être le processus abiotique le plus probablement responsable de la perte abiotique en 2- et 3-chlorophénol.

En effet, suivant la définition Européenne des composés organiques volatiles parue dans l'article 2 de la directive 1999/13/CE du conseil du 11 mars 1999, qui désigne un composé organique volatil comme étant tout composé organique ayant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus à une température de 293,15 K ou ayant une volatilité correspondante dans les conditions d'utilisation particulières, dans ces conditions les deux isomères peuvent être considérés très volatiles (**134**). Les monochlorophénols ont en outre une solubilité relativement élevée. Cette dernière est sensée aider à leur volatilisation rapide (**135**).

Le 2-chlorophénol présente la pression de vapeur la plus élevée, comparativement aux autres chlorophénols, il est de ce fait le plus évaporé. Ceci justifie la différence dans la perte abiotique entre les deux isomères. Les pressions de vapeur du 2 et du 3-chlorophénol sont de **2,25 et 1 mm Hg** respectivement à **20 °C**. Ces valeurs sont encore plus élevées à **30° C** (température d'incubation) car plus la température est élevée plus la concentration de la molécule augmente dans la phase gazeuse et inversement.

Par ailleurs, étant dans un système clos (des seringues), après un certain temps, un équilibre s'établit entre le liquide et la vapeur qui le surmonte lorsque le nombre de molécules qui le quittent égale le nombre de molécules qui le réintègrent. Ceci dit et à un moment donné, la perte abiotique par volatilisation s'arrête. Toutefois, le processus de volatilisation reprend au moment du dosage car les seringues seront ouvertes et le milieu serait au contact de l'air.

La comparaison entre la dégradation biotique et abiotique (test student) montre que la différence entre les deux processus de dégradation, dans nos conditions expérimentales, est significative (**annexe 6**). Dans le milieu naturel, la volatilisation de monochlorophénols conduit à leur élimination dans l'atmosphère avant d'être dégradés. La volatilisation ne peut alors avoir un effet protecteur vis-à-vis des sols contaminés car elle crée une nouvelle pollution (pollution de l'air) et provoque le transfert des polluants sur d'autres sites.

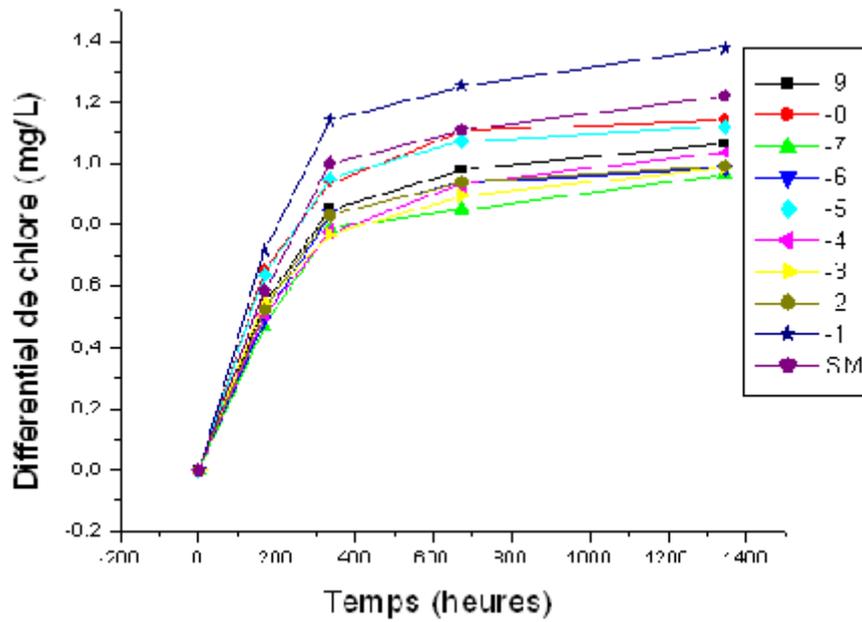


Figure 32. Libération de chlore au cours de la dégradation du 2-chlorophenol.

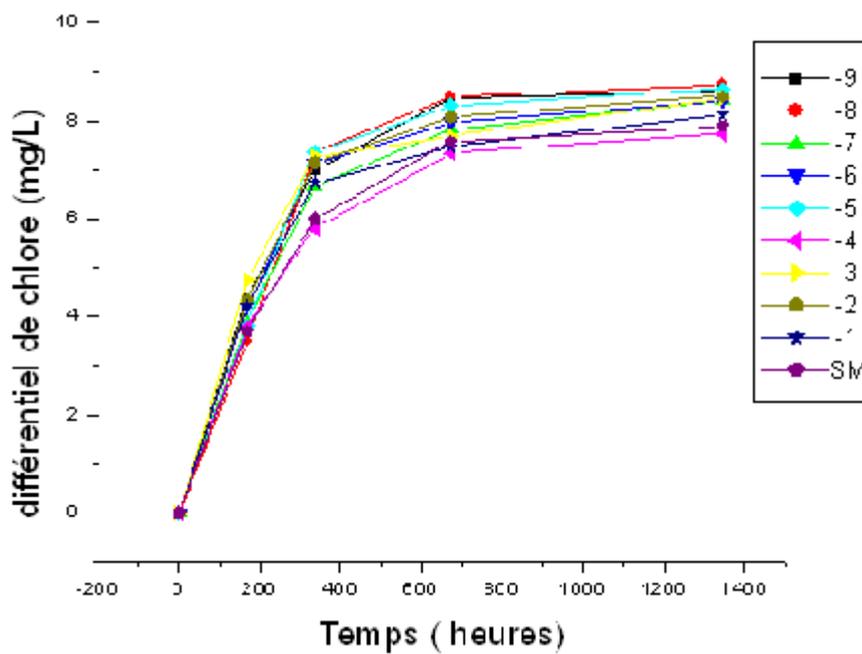
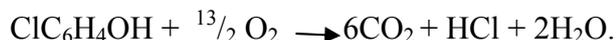


Figure 33. Libération de chlore au cours de la dégradation du 3-chlorophenol.

3. Libération de chlore

Le dosage de chlore donne une indication sur le niveau de la biodégradation des deux isomères. La minéralisation de monochlorophénols est signalée par une libération stœchiométrique de chlore, du CO₂ et de l'eau dans le milieu, selon l'équation finale suivante :



Bien que jusqu'à **52%** de la concentration initiale du 3-chlorophénol ont pu être dégradés par la microflore du sol, près de **28 %** seulement de chlore sont libérés dans le milieu à la fin de l'expérience. Le pourcentage d'ions chlorure totaux libérés à la fin de dégradation du 2-chlorophénol ne dépasse pas les **10 %**. La libération non stœchiométrique des ions chlorure au cours de la biodégradation des deux isomères prouve leurs dégradation incomplète. Au fait, les résultats obtenus démontrent que les deux isomères ne sont pas minéralisés mais probablement biotransformés en métabolites intermédiaires chlorés, dont la polymérisation est visualisée par l'apparition dans le milieu d'une coloration marron caractéristique du phénomène (résultat précédent). Aucune libération de chlorure n'est enregistrée pour les témoins stériles des deux isomères, ce qui élimine la supposition d'une minéralisation par un mécanisme abiotique. La libération de chlore est donc le résultat de l'action des microorganismes sur les monochlorophénols.

4. Variation du pH du milieu

La biodégradation est accompagnée par un léger changement des valeurs du pH (**annexe 7**) probablement à cause de l'effet tampon qu'exerce le milieu de culture. La quantité de l'ion chlorure libéré au cours de la biodégradation est faible et par conséquent la formation de l'acide chlorhydrique dans le milieu l'est aussi ce qui explique la faible baisse du pH.

5. Production de gaz in vitro

Quelle que soit la dilution considérée, aucune production de gaz n'est enregistrée sur toute la période d'incubation par la technique des seringues, pour les deux isomères. Ce résultat corrobore avec nos conclusions précédentes.

Partie microbiologique

Identification des microorganismes dominants responsables de la biodégradation

1. Identification des souches bactériennes

1.1. Tests préliminaires

A partir des cultures des deux isomères, trois souches bactériennes d'aspects morphologiques différents ont été isolées et purifiées par plusieurs repiquages successifs. L'une des souches (**B1**) produit une pigmentation verte, diffusant dans toute la boîte de Pétri. De plus, une odeur caractéristique de la fleur de seringa s'exhale de ses cultures. Ces observations ont fortement orienté le diagnostique et l'identification vers le groupe des *Pseudomonas*. La souche pigmentée pousse bien sur le milieu PIA, ce qui vient confirmer nos suggestions.

1.1.1. L'examen à l'état frais

L'examen à l'état frais montre que les souches bactériennes purifiées présentent des formes bacillaires mobiles. La mobilité est confirmée sur milieu mannitol-mobilité.

1.1.2. Coloration de Gram

Toutes les souches purifiées sont à Gram négatif.

1.1.3. Type respiratoire

Les souches purifiées ne poussent qu'en surface des tubes VF, elles sont de ce fait toutes aérobies.

1.1.4. King A et King B

La souche **B1** présente une réaction positive avec le King B mais pas avec le King A. Elle produit donc la pyoverdine mais pas la pyocyanine.

Ces résultats préliminaires nous ont orienté vers l'utilisation des API 20 NE destinées aux bacilles Gram négatif non entérobactéries.

1.2. Résultats d'identification sur galerie API 20 NE

La souche B1

Après l'addition des réactifs nitrite 1 et nitrite 2, on a noté l'absence d'une coloration rouge. Ceci signe l'absence des nitrites dans le milieu. Néanmoins, ce résultat ne signifie pas que la souche ne possède pas une nitrate réductase. En effet, l'ajout de la poudre de zinc, capable de réduire les nitrates du milieu, n'a montré aucune coloration. Cette observation signifie que la souche possède une nitrate réductase très active, capable de réduire les nitrates du milieu au-delà des nitrites, jusqu'au stade diazote, ce dernier est bien signalé par la formation des microbulles. La souche ne produit pas d'indole. Elle oxyde le Glucose, le mannitol, le N-acétyl-glucosamine, le gluconate, le caprate, l'adipate, le malate et le citrate. Les testes d'assimilation montrent qu'elle n'assimile pas l'arabinose, le mannose, le maltose et le phénylacétate. Une réponse positive est obtenue pour les tests de l'arginine dihydrolase, l'uréase, et l'hydrolyse de la gélatine. Par contre, une réaction négative est obtenue pour le test de l'esculinase et la β - galactosidase. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche B1 comme étant *Pseudomonas aeruginosa* (annexe 8). La souche B1 est selon le résultat du King A et king B une *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanine – pyoverdine +.

La souche B2

La souche ne possède pas une nitrate réductase, comme le prouve la coloration rouge après l'addition de la poudre de zinc. Elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Les tests d'assimilation montrent qu'elle assimile le gluconate, le caprate, le malate, le citrate, et le phénylacétate seulement. Elle possède une argénine dihydrolase et une uréase mais pas une esculinase, ni une para-notrophény-galactopyranosidase. Le profil numérique obtenu permet d'identifier la souche B2 comme étant *Pseudomonas putida* (annexe 8).

La souche B3

La souche est oxydase négative. Le test NO₃ montre qu'elle réduit le nitrate en nitrite. Elle ne produit pas d'indole et ne fermente pas le glucose. Elle assimile tous les substrats sauf le caprate, l'adipate et le phénylacétate. Elle hydrolyse la gélatine et possède une esculinase, une PNPG-hydrolase mais pas une uréase et une arginine dihydrolase. Le profil numérique obtenu permet l'identification de la souche B3 comme étant *Chryseomonas luteola* (annexe 8).

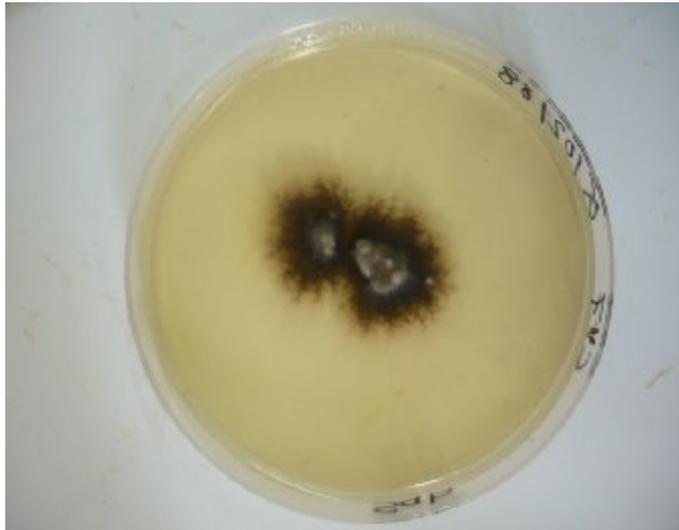


Figure 34. Aspect macroscopique (souche A₁).



Figure 35 (a et b). Aspect microscopique (souche A₁).

2. Identification des souches de moisissures

Deux souches de moisissures, **A₁** et **A₂**, apparues après 2 mois dans les cultures de 2-chlorophénol (dilution 10⁻⁷), sont isolées et purifiées sur milieu sabouraud.

2.1. Identification de la souche **A₁**

2.1.1. Aspect macroscopique

Les cultures sont de pousse rapide, laineuse et de couleur noirâtre. La surface des colonies est hétérogène (**Figure 34**), elle présente des zones blanches constituées exclusivement d'hyphes aériennes et des zones sombres rasantes renfermant des spores asexuées mélanisées.

2.1.2. Aspect microscopique

L'observation microscopique par les deux techniques met en évidence des hyphes septées. Les conidiophores bruns, septés, portent des conidies disposées en chaînes acropétales ou isolées, d'aspect piriforme ou ovoïde à base élargie avec des cloisonnements transversaux et longitudinaux au nombre variable. Des tubes germinateurs sont observés à la surface de certaines conidies (**Figure 35**).

La souche **A₁** peut être donc rapprochée au genre *Alternaria sp* (136).

2.2. Identification de la souche **A₂**

2.2.1. Aspect macroscopique

Les colonies d'une croissance moyennement rapide, ont un aspect poudreux. Elles sont de couleur vert-jaune (**Figure 36**).

2.2.2. Aspect microscopique

Le conidiophore est renflé en vésicule. Cette dernière est recouverte de métules qui portent les phialides (tête bisériée). De longues chaînes de conidies sont formées à partir des phialides (**Figure 37**).

La souche **A₂** peut être donc rapprochée au genre *Aspergillus sp* (136).

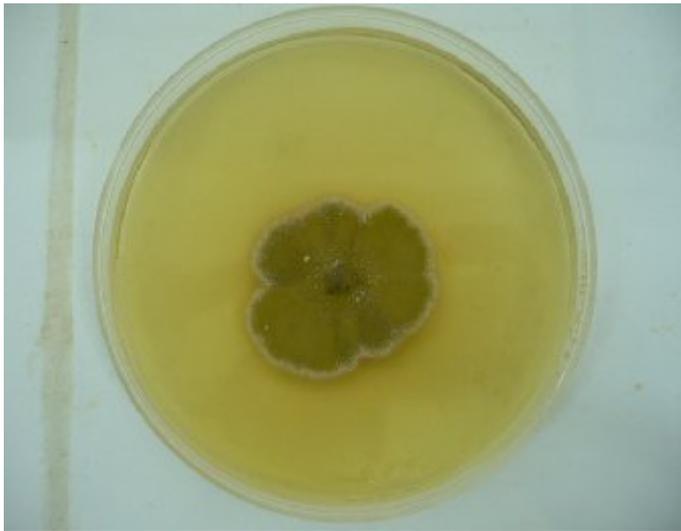


Figure 36. Aspect macroscopique de la souche A₂.



Figure 37. Aspect microscopique de la souche A₂.

L'ensemencement des deux souches de moisissures sur un milieu minimum gélosé contenant le 2-chlorophénol ou le 3-chlorophénol, a montré que ces moisissures étaient incapables de les utiliser comme seule source de carbone et d'énergie. Par contre, les souches bactériennes se sont montrées capables de croître sur le même milieu, contenant les monochlorophénols comme seule source de carbone et d'énergie.

Le résultat concernant les moisissures est en accord avec les travaux faits sur *Candida maltosa* (137), *Candida tropicalis* (138), *Rhodotorula glutinis* (139), *Trichosporon cutanium* (140), et la deuteromycete *Penicillium frequentans* (112, 141) toutes incapables d'utiliser les monochlorophénols comme seule source de carbone et d'énergie. Cependant, le 2-chlorophénol est transformé par cométabolisme en présence de phénol en 3-chlorocatéchol et cis,cis-2chloromuconate par *Candida maltosa* (137), et en 3-chlorocatéchol par *Penicillium frequentans* (112). Le 3-chlorophénol est transformé, aussi par cométabolisme, par *Penicillium simplicissimum* SK9117, majoritairement en 4-chlorocatéchol (142). Tous ces résultats prouvent que les champignons ont la capacité de transformer ou minéraliser par **cométabolisme** certains monochlorophénols. Mais ils sont incapables de les utiliser comme source de carbone et d'énergie.

Dans notre essai, il semble que les moisissures, si elles viennent contribuer à la dégradation du 2-chlorophénol, alors cette contribution ne pourrait être que par cométabolisme et ceci après avoir eu une source de carbone et d'énergie, probablement obtenue suite à une certaine mortalité bactérienne vu la toxicité des métabolites. C'est pourquoi les moisissures ne sont apparues que très tardivement, à la fin de notre cinétique. Cependant, leur apparition peut être au détriment des bactéries mortes ; comme aucun travail à nos connaissances, n'a montré la capacité des moisissures à utiliser les chlorocatéchols comme source de carbone et d'énergie, il est probable que leur pousse soit basée sur les composés cellulaires bactériens libérés dans le milieu.

D'après les résultats obtenus, on peut conclure que la biodégradation du 2 et du 3-chlorophénol est principalement l'action d'espèces bactériennes.

Les bactéries jouent un rôle fondamental dans la dégradation des polluants chloroaromatiques (143). Elles semblent être le groupe microbien le plus intéressant dans la biodégradation de polluants vue l'immense diversité et capacité de leur métabolisme.

Les trois espèces identifiées sont déjà rapportées dans de nombreux travaux de biodégradation, comme étant capables d'utiliser les chlorophénols comme seule source de carbone et d'énergie (144, 145).

Nos espèces bactériennes ont prouvé leur capacité à dégrader les deux isomères. En effet, elles ont pu garder leur intégrité cellulaire et dégrader les monochlorophénols au profit de leur croissance tout au long de la période d'incubation. Ce qui est intéressant à signaler, c'est l'absence de la coloration marron caractéristique de la polymérisation des métabolites de la biodégradation dans les dilutions les plus élevées, à partir desquelles nos isollements ont été effectués, une coloration verte est en revanche notée. Cette dernière n'est probablement que la pyoverdine ; pigment produit par *Pseudomonas aeruginosa*.

La capacité de nos souches à dégrader les deux types d'isomères est d'intérêt pour la dépollution des sites contaminés qui comprennent souvent plusieurs types de polluants à la fois. *Pseudomonas aeruginosa* est connue par la variabilité et les capacités de son métabolisme (146). Elle est capable de dégrader une large variété de polluants (147, 148) dont divers chlorophénols. Elle pourrait donc être un outil très important de bioremédiation. Néanmoins, l'espèce est aussi connue par son caractère pathogène. De fait, la souche est un pathogène opportuniste (149, 150), à la fois pour les espèces hospitalières et d'environnement (119). Contrairement à *Pseudomonas aeruginosa*, le génome de *P. putida* manque des gènes codant pour les enzymes qui digèrent la membrane cellulaire, et peut être, de ce fait, préférée dans les traitements de biodégradation (151). De plus, la capacité de la souche à s'agréger lui donne une importance dans le domaine de la bioremédiation, particulièrement dans le processus des boues activées où sa floculation lui permet de rester dans les boues plus de temps, la protégeant aussi de la prédation. Par ailleurs, une solution possible est de rechercher, au niveau moléculaire, les gènes d'intérêt pour la biodégradation pour construire des souches plus performantes à l'application dans la décontamination des sites pollués.

Les chlorophénols sont utilisés en agriculture, en industrie et en santé publique depuis les années 1920. Leur toxicité a engendré leur classification par l'OMS dans la liste des polluants majeurs (1). L'utilisation des chlorophénols est limitée, voire arrêtée dans plusieurs pays. Cependant, la contamination des milieux naturels par les chlorophénols reste un sérieux problème dans les pays où les produits de préservation du bois et les produits phytosanitaires à base de ces composés restent d'usage courant.

Le but principal de ce travail est l'évaluation de la biodégradation de deux isomères de monochlorophénols, à savoir le 2- et le **3-chlorophénol** par la microflore totale d'un sol agricole de la plaine d'El Harrouch dans la wilaya de Skikda, ainsi que l'isolement et l'identification de souches microbiennes dominantes impliquées dans leur dégradation.

Les résultats de la cinétique de la biodégradation du 2 et du 3-chlorophénol montrent que la dégradation des deux isomères commence très tôt, à $t = 2$ h. De plus, le dosage qualitatif des composés phénoliques intrinsèques montre une concentration de 0,98 mg - 1,59 mg/ L. Ce qui explique probablement la dégradation sans phase de latence par un microbiote tellurique déjà adapté aux xénobiotiques étudiés ou au moins à leur famille de molécules. Les microorganismes ayant alors les enzymes nécessaires à la dégradation, préalablement induites et grâce auxquelles la dégradation des deux isomères a pu commencer aussi rapidement.

Les vitesses de dégradation instantanées du 3-chlorophénol sont **3 à 4 fois** plus importantes que celles de son isomère, cette différence peut être liée à la position de l'atome de chlore sur le cycle aromatique qui influe non seulement sur la vitesse mais aussi sur la voie de la biodégradation. La majeure partie de la biodégradation est notée au cours des 7 premiers jours d'incubation. Au-delà, le processus de biodégradation décélère avec le temps jusqu'à atteindre des vitesses remarquablement faibles où la biodégradation est quasi nulle. Cette décélération est probablement due à l'effet toxique qu'exercent les produits métaboliques de dégradation sur les microorganismes impliqués. Ces métabolites s'accumulent dans le milieu et finissent par former des polymères qui induisent l'apparition d'une coloration marron, caractéristique du phénomène. Une autre explication fortement probable est l'effet limitant qu'engendre l'épuisement de l'oxygène du milieu sur la biodégradation.

Le taux de la biodégradation du 2-chlorophénol est faible alors que celui de son isomère s'avère meilleur. Mais il reste encore non satisfaisant compte tenu de la longue période d'incubation (2 mois). L'assimilation et la métabolisation du 3-chlorophénol semblent être plus aisées, suggérant ainsi que les voies et par conséquent les métabolites de dégradation de l'un et l'autre des deux substrats ne sont probablement pas les mêmes.

Aucune production de gaz n'est enregistrée sur toute la période d'incubation pour les deux isomères. De plus, la libération non stœchiométrique de chlore au cours de la biodégradation prouve que cette dernière n'est pas complète. Les deux isomères sont donc probablement biotransformés en métabolites chlorés, avec une toxicité qui semble être supérieure à leur toxicité d'origine, ce phénomène pourrait être responsable d'un éventuel blocage des voies de dégradation.

Notre travail démontre la persistance des deux isomères dans le milieu. A la fin de la cinétique de dégradation, prolongée sur 2 mois, **77 % et 48 %** en 2 et 3-chlorophénol respectivement, persistent encore dans le milieu de culture.

Selon les résultats du traitement statistique, la dilution de l'inoculum n'a présenté aucun effet sur la biodégradation des deux isomères. Ceci peut s'interpréter par le fait que la biodégradation est efficacement exercée, et de manière principale, par les microorganismes dominants du milieu.

Une perte abiotique en substrats est également enregistrée pour les témoins stériles des deux isomères. L'absence d'une libération d'ions chlorure au niveau de ces derniers montre que les deux isomères ne sont pas dégradés par les processus abiotiques connus. Cette perte pourrait être due à la volatilisation mais ce dernier mécanisme reste aussi limité vu le volume réduit de volatilisation dans le cadre de notre protocole expérimental. Seule une analyse complète des produits terminaux à l'issue de la période d'incubation pourrait donner des réponses probantes sur les produits et les mécanismes de dégradations biotiques et abiotiques.

Trois souches bactériennes sont isolées à partir des dilutions les plus élevées des deux isomères. Les souches sont identifiées comme étant : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* et *Chryseomonas luteola*.

Ces souches se sont montrées capables d'utiliser les deux isomères comme seule source de carbone et d'énergie et de résister à leur toxicité comme le prouve leur présence dans le milieu tout au long de la période d'étude. Deux souches de moisissure rapprochées aux genres *Alternaria* sp et *Aspergillus* sp sont également isolées à partir des cultures du 2-chlorophénol (dilution 10^{-7}) à la fin des deux mois. Cependant, elles sont incapables d'utiliser ce substrat comme seule source de carbone et d'énergie. La biodégradation des monochlorophénols étudiés est donc probablement due en majeure partie à l'action des espèces bactériennes.

En perspective, on peut prévoir l'étude de plusieurs aspects complémentaires à nos résultats :

- Il est indispensable d'identifier les métabolites intermédiaires et terminaux de dégradation des deux substrats.
- Il serait intéressant d'effectuer l'étude dans un système de culture permettant un approvisionnement continu du milieu en oxygène.
- Il serait également intéressant d'étudier et de comparer la dégradation des molécules substrats par chacune des bactéries isolées et identifiées, de déterminer les voies de dégradation et d'affiner l'étude jusqu'au niveau moléculaire.

- (1) Haggblom M. M., Young L. Y., 1990. Chlorophenol Degradation Coupled to Sulfate Reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 3255-3260.
- (2) Fava F., Armenante P. M & Kafkewitz D., 1995. Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by a *Pseudomonas pickettii* strain. *Applied Microbiology*, **21**: 307-312.
- (3) Chiavola A., McSwain B. S., Irvine R. L., Boni M. R., Baciocchi R., 2003. *Journal of Environmental Science And Health*, **38**: 2113–2123.
- (4) Cheng R., Wang J. L., Zhang W. X., 2007. Comparison of reductive dechlorination of *p*-chlorophenol using Fe⁰ and nanosized Fe⁰. *Journal of Hazardous Materials*, **144** : 334–339.
- (5) Bliefert C, Perraud R. 2001. Chimie de l'environnement air, eau, sols, déchets. 1^{ère} édition. De Boeck, Bruxelles, 56-343.
- (6) Calvet R., 2003. Le Sol. Propriétés et fonctions. Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Ed France Agricole - Dunod, 82 - 93.
- (7) Calvet R., 2003. Le Sol. Propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques. Applications agronomiques et environnementales. Tome 2. Ed France Agricole - Dunod, 381-391.
- (8) Davet P., 1996. Le milieu « sol ». Dans Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris, 21-87.
- (9) Stephanie A. E., John A. B., Thomas M. S., 2007. Isolation and characterization of soil Bacteria That Define Terriglobus gen. nov; in the phylum Acidobacteria. *Applied and environmental microbiology*, **73**: 2708-2717.
- (10) Gans J., Wolinsky M., Dunbar J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309** : 1387-90.
- (11) Nielsen K. M., Bones A. M., Smalla K., Van Elsas J. D., 1998. Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria : a rare event? *FEMS microbiology reviews*, **22** : 79-103.
- (12) Bourrelier P. H., Berthelin J., 1998. Introduction générale. Dans : Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion (rapport n= 42). Ed Technique & Documentation lavoisier Pari, XXXVII.
- (13) Laurent C., Feidt C., Laurent F., 2005. Contamination des sols - Transferts des sols vers les animaux. EDP Sciences/ADEME, 19-20.
- (14) Perry J. J., Staley J. T., Lory S., 2004. Microbiologie. DUNOD (France), 848.
- (15) Hanna K., 2004. Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules "cage" dans la dépollution des sols: solubilisation et extraction de polluants organiques par cyclodextrines. *Thèse de Doctorat*. Institute national des sciences appliqués de Lyon (France).

- (16) Aislabie J., Lloyd-Jones G., 1995. A review of bacterial degradation of pesticides. *Aust. J. Soil Res*, **33**: 925-942.
- (17) Labrecque M. H., 2003. Etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène. *Mémoire (M. Sc)*. Université Laval (Québec).
- (18) Bending, G. D., Rodríguez-Cruz, M.S., 2007. Microbial aspects of the interaction between soil depth and biodegradation of the herbicide isoproturon. *Chemosphere*, **66** : 664-671.
- (19) Alexander M., 1973. No biodegradable and other recalcitrant molecules. *Biotechnol .Bioeng*, **15**: 611-615.
- (20) Martinelli I., 1999. Infiltration des eaux de ruissellement pluvial et transfert de polluants associés dans le sol, urbain. *Thèse de Doctorat*. INSA de Lyon (France).
- (21) Bocard C., 2006. Marées noires et sols pollués par des hydrocarbures. Enjeux environnementaux et traitement des pollutions. 1^{ère} Ed TECHNIP, 94.
- (22) Dalton H., Stirling D. I., 1982. Co-metabolism. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B*, **297** : 481-496.
- (23) NEX F., 2004. Modélisation numérique de la biodégradation des composés organochlorés dans les aquifères fondées sur des expérimentations *in situ*. Le cas des chloroéthènes. *Thèse de doctorat*. Université Louis Pasteur. Strasbourg (France).
- (24) Vandecasteele J. P., 2005. Microbiologie pétrolière - Concepts - Implications environnementales - Applications industrielles. 1^{ère} Ed TECHNIP, 441.
- (25) Han Y. L., Kuo M. C. T., Tseng I.C., Lu C.J., 2007. Semi continuous microcosm study of aerobic cometabolism of trichloroethylene using toluene. *Journal of Hazardous Materials*, **148**: 583-591.
- (26) Alexander M., 1981. Biodegradation of chemicals of environmental concern. *Science*, **211** : 132 – 138.
- (27) Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M. P., Coquet Y. chapitre 5 dégradation des pesticides. Dans les pesticides dans le sol - Conséquences agronomiques et environnementales. Ed France Agricole, 255-299.
- (28) Bollag J. M., Loll M. J., 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia*, **39** : 1221-1231.
- (29) Puglisi E, Cappa F., Fragoulis G., Trevisan M., Del Re A. A. M., 2007. Bioavailability and degradation of phenanthrene in compost amended soils. *Chemosphere*, **67**: 548–556.
- (30) http://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9pollution_des_sols.

- (31) **Cunningham S. D., Berti W. R., Huang J. W., 1995.** Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, **13**: 393–397.
- (32) **Fellet G., Marchiol L., Perosa D., Zerbi G., 2007.** The application of phytoremediation technology in a soil contaminated by pyrite cinders. *Ecological Engineering*, **31**: 207–214.
- (33) **He Z. L., Yanga, X. E., Stoffellab, P. J., 2005.** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med Biol*, **19**: 125–140.
- (34) **Susarla S., Medina V. F., McCutcheon S. C., 2002.** Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **18** : 647–658.
- (35) **Cadiere F., 2006.** Traitement biologique des sols pollués : recherche et innovation. Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, 16-17.
- (36) **Penarroya J. B., 2007.** Coupled Photochemical-biological System to treat biorecalcitrant wastewaters. *PhD thesis*. University of Barcelona (Spain).
- (39) **Cooper A. R., Overholt L. M. D., Tillquist H. M. S., Jamison D., 1997.** Cooper's toxic exposures. Desk reference. CRC. Lewis publishers, 582.
- (40) **Montgomery D. J. H., 1991.** Groundwater chemicals field guide. CRC Press, 48.
- (41) **Rao N. N., Dubey A. K., Mohanty S., Khare P., Jain R., Kaul S. N., 2003.** Photocatalytic degradation of 2-chlorophenol: a study of kinetics, intermediates and biodegradability. *Journal of Hazardous Materials*, **101**: 301-314.
- (42) **Buikema A. L. J., McGinniss M. J, Car-ins J. J., 1979.** Phenolics in aquatic ecosystems: A selected review of recent literature. *Mar Environ Res*, **2** : 87-181.
- (43) **Hites RA, Jungclaus GA, Lopez-Avila V, et al. 1979.** Potentially toxic organic compounds in industrial wastewaters and river systems: Two case studies. *ACS Symp Ser*, **94**: 63-90.
- (44) **Jharna D., Amiya K. M., Deba P. M., Pran K. C., Prantosh B., Prasanta K. R., 2000.** Metabolism of g-hexachlorocyclohexane by *Arthrobacter citreus* strain BI-100: Identification of metabolites. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **46**: 59–67.
- (45) **Haider K., Jagnow G., Kohnen R., Lim S. U., 1974.** Degradation of chlorinated benzenes, phenols and cyclohexane derivatives by benzene and phenol utilizing soil bacteria under aerobic conditions. *Arch Microbiol*, **96** : 183-200.
- (46) **Ballschmitter K., Scholz C., 1980.** Microbial decomposition of chlorinated aromatic substances: VI. Formation of dichlorophenols and dichloropyrocatechol from dichlorobenzenes in a micromolar solution by *Pseudomonas* species. *Chemosphere*, **9** : 457-467.
- (47) **Exon J. H., 1984.** A review of chlorinated phenols. *Veterinary and human toxicology*, **26**: 508-20.

- (48) Pouloupouloss S. G., Korologos C. A., Boulamanti A., Philippopoulos C. J., 2007. Treatment of 2-chlorophenol aqueous solutions by wet oxidation. *Water research*, **41**: 1263-1268.
- (49) Folke J, Lindgaard Joergensen P., 1985. Organics in wheat and rye straw pulp bleaching and combined mill effluents. I. Chemical characterization and biodegradation studies. *Toxicological & Environmental Chemistry*, **10**: 1-24.
- (50) Ivanciuc T., Ivanciuc O & Klein D. J., 2006. Prediction of Environmental Properties for Chlorophenols with Posetic Quantitative Super-Structure/Property Relationships (QSSPR). *International Journal of Molecular Sciences*, **7**: 358-374.
- (51) Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol.2. *Health criteria and other supporting information*. World Health Organization, Geneva, 1996.
- (52) Krijgheld K. R., Vandergen A., 1986. Assessment of the impact of the emission of certain organochlorine compounds on the aquatic environment. I: Monochlorophenols and 2,4 dichlorophenol. *Chemosphere*, **15**: 825-860.
- (53) Piwoni M. D., Wilson J. T., Walters D. M., 1986. Behavior of organic pollutants during rapid-infiltration of wastewater into soil. I. Processes, definition, and characterization using a microcosm. *Hazard Waste Hazard Mater*, **3**: 43-55.
- (54) Chiou C. T., Freed V. H., Peters L. J., 1980. Evaporation of solutes from water. *Environ Inter*, **3**: 231-236.
- (55) Isaacson P. J., Frink C. R., 1984. Nonreversible sorption of phenolic compounds by sediment fractions: The role of sediment organic matter. *Environmental Science & Technology*, **18**: 43-46.
- (56) Bhandari A., Novak J. T., Berry D. F., 1996. Binding of 4-monochlorophenol to soil. *Environmental Science & Technology*, **30**: 2305-2311.
- (57) Bunce N. J., Nakai J. S., 1989. Atmospheric Chemistry of chlorinated phenols. *Journal of Air Pollution Control Association*, **39**: 820-823.
- (58) Nkagawa S., Shimokawa T., 2002. Degradation of halogenated carbons in alkaline alcohol. *Radiation Physics and Chemistry*, **63**: 151-156.
- (59) Boule P., Guyon G., Lemaire J., 1982. Photochemistry and environnement IV-photochemical behavior of monochlorophénols in dilute aqueous solution, *Chemosphère*, **11**: 1179-1188.
- (60) Akail N., Kudoh S., Takayanagi M., Nakata M., 2001. Photoreaction mechanisms of 2-chlorophenol and its multiple chloro-substituted derivatives studied by low-temperature matrix-isolation infrared spectroscopy and density-functional-theory calculations, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **146**: 49-57.

- (61) Kawaguchi H., 1992. Determination of direct and indirect photolysis rates of 2-cp in humic acid solution and natural waters. *Chemosphere*, **25**: 635-611.
- (62) Hirvonen A., Trapido M., Hentunen J., Tarhanen J., 2000. Formation of hydroxylated and dimeric intermediated during oxidation of chlorinated pheols in aqueous solution. *Chemosphere*, **41**: 1211-1218.
- (63) Hugul M., Apak R., Dimirci S., 2000. Modeling the kinetics of UV/ hydrogen peroxide oxidation of some mono-, di and trichlorophenols. *Journal of Hazardous Materials*, **77**: 193-208.
- (64) Miille M. J., Crosby D. G., 1983. Pentachlorophenol and 3,4-dichloroaniline as model for photochemical reaction In seawater. *Marine chemistry*, **14**: 111-120.
- (65) Czaplica M., 2005. The kinetic study of photodégradation of chlorophenols in aquatic invironment. *Polish Journal of Chemical Technology*, **7**: 8-12.
- (66) Hirvonen A., Trapido M., Hentunen J., Tarhanen J., 2000. Formation of hydroxylated and dimeric intermediates during Oxidation of chlorinated phenols in aqueus solution. *Chemosphere*, **41**: 1211-1218.
- (67) De A. K., Chaudhuri B., Bhattacharjee S., Dutta B. K., 1999. Estimation of OH radical reation rate contants for Phenol and chlorinated phenols using UV/H₂O₂ photo-oxidation. *Journal of Hazardous Materials*, **64**: 91-104.
- (68) Gerdes R., Dohrle W., Spiller W., Schneider G., Schnuerpfeil G., Schlz-Ekloff G., 1997. Photo-oxidation of phenol And monochlorophenols in oxygen-saturated aqueous solutions by different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, **111**: 65-74.
- (69) Onoye A. I., McItosh A. R., Bolton J. R., 1986. Mechanism of the photochemistry of *p*-benzoquinone in aqueous Solution. 1. Spin trapping and flash photolysis electron paramagnetic resonance studies. *Journal of Physical Chemistry*, **90**: 6266-6270.
- (70) Field J. A., Sierra-Alvarez R., 2008. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Environmental Science and Biotechnlogie*, **7**: 211–241.
- (71) Farrell A & Quilty B., 1999. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a *meta*- cleavage pathway. *Biodegradation*, **10**: 353–362.
- (72) Krooneman J., Akker S. V. D, Gomes T. M. P., Forney L. J., Gottschal J. C., 1999. Degradation of 3-Chlorobenzoate under Low-Oxygen Conditions in Pure and Mixed Cultures of the Anoxygenic Photoheterotroph *Rhodopseudomonas palustris* DCP3 and an Aerobic *Alcaligenes* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 131-137.
- (73) Häggblom M., 1989. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. *Journal of Basic Microbiology*, **30**: 115 – 141.

- (74) Hollender J., Hopp J., Dott W., 1997. Degradation of 4-Chlorophenol via the meta Cleavage Pathway by *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4567-4572.
- (75) Hollender J., Dott W., Hopp J., 1994. Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**: 2330–2338.
- (76) Dorn E., Knackmuss H. J., 1978. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Two catechol 1,2-dioxygenases from a 3-chlorobenzoate-grown pseudomonad. *Biochemical Journal*, **174**: 73–84.
- (77) Schmidt E., Hellwig M., Knackmuss H. J., 1983. Degradation of chlorophenols by a defined mixed microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, **46**: 1038-1044.
- (78) Mars A. E., Kasberg T., Kaschabek S. R., Van agteren M. H., Janssen D. B., Reineke W., 1997. Microbial degradation of chloroaromatics : Use of the meta-cleavage pathway for mineralisation of chlorobenzene. *Journal of Bacteriology*, **179**: 4530-4537.
- (79) Klecka G. M., Gibson D. T., 1981. Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Applied and Environmental Microbiology*, **41**: 1159-1165.
- (80) Bartels I., Knackmuss H. J., Reineke W., 1984. Suicide Inactivation of Catechol 2,3-Dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-Halocatechols. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**: 500-505.
- (81) Balfanz J & Rehm H. J., 1991. Biodegradation of 4-chlorophenol by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp. A 7-2 in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **35**: 662–668.
- (82) Weiser M., Eberspächer J., Vogler B & Lingens F., 1994. Metabolism of 4-chlorophenol by *Azotobacter* sp. GP1: Structure of the meta-cleavage product of 4-chlorocatechol. *FEMS Microbiol. Lett*, **116**: 73–78.
- (83) Sung Bae H., Lee J. M., Bae Kim Y & Lee S. T., 1996. Biodegradation of the mixtures of 4-chlorophenol and phenol by *Comamonas testosteroni* CPW301. *Biodegradation*, **7**: 463–469.
- (84) Sun B., Cole J. R., Sanford R. A & Tiedje J. M., 2000. Isolation and Characterization of *Desulfovibrio dechloracetivorans* sp. nov., a Marine Dechlorinating Bacterium Growing by Coupling the Oxidation of Acetate to the Reductive Dechlorination of 2-Chlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 2408-2413.
- (85) Bouchard B., Beaudet R., Villemur R., McSween G., Lepine F., Bisailon J. G., 1996. Isolation and characterization of *Desulfitobacterium frappieri* sp. nov., an anaerobic bacterium which reductively dechlorinates pentachlorophenol to 3-chlorophenol ; *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**: 1010-1015.

- (86) Madsen T & Licht D., 1992. Isolation and characterization of an anaerobic chlorophenol-transforming bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2874-2878.
- (87) Mohn, W. W & Tiedje J. M., 1992. Microbial reductive dehalogenation. *Microbiol. Reviews*, **56**: 482-507.
- (88) Becker J. G., Stahl D. A., Rittmann B. E., 1999. Reductive Dehalogenation and Conversion of 2-Chlorophenol to 3-Chlorobenzoate in a Methanogenic Sediment Community: Implications for Predicting the Environmental Fate of Chlorinated Pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**: 5169-5172.
- (89) Farroukhi M., Mesdaghinia A. R., 2007. Removal of 3-monochlorophenol in Anaerobic Baffled Reactor. *Journal of Applied Science*, **7**: 1652-1655.
- (90) Sharak Genthner B. R., Allen Price W., Pritchard P. H., 1989. Characterization of Anaerobic Dechlorinating Consortia Derived from Aquatic Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**: 1472–1476.
- (91) Boyd S. A., Shelton D. R., Berry D., Tiedje J. M., 1983. Anaerobic biodegradation of phenolic compounds in digested sludge. *Appl Environ Microbiol*, **46**: 50-54.
- (92) Sharak G. B. R., Townsend G. T., Chapman P. J., 1991. Para-hydroxybenzoate as an intermediate in the anaerobic transformation of phenol to benzoate. *FEMS Microbiology letters*, **78**: 265-269.
- (93) Czaplica M., 2004. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment . *Science of the Total Environment*, **322**: 21-39.
- (94) Bouhadja A., Saad dajabalah L., Otmane M. 2005. Extension du périmètre d'irrigation. Secteur 3 El Harrouch (Skikda). *Mémoire de fin d'études*. Université 20 Aout 1955 (Skikda).
- (95) Cullimore D. R., 1981. The enumeration of 2,4-D degraders in Saskatchewan soils. *Weed Science*, **29** : 440-443.
- (96) Bousseboua H., 2002. Techniques d'étude des bactéries. Dans *Microbiologie générale*. Ed de l'université Mentouri, Constantine (Algérie), 145-157.
- (97) Tamer E., Hamid Z., Amin M. A., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieyette B., 2006. Sequential UV-biological degradation of chlorophenols. *Chemosphere*, **63**: 277-284.
- (98) Tamer E., Hamid Z., Amin M. A., El Tayeb O., Mattiasson B., Guieyette B., 2007. Sequential photochemical–biological degradation of chlorophenols. *Chemosphere*, **66**: 2201–2209.
- (99) Ka J. O., Holben W. E., Tiedje J. M., 1994. Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Appl Environ Microbiol*, **4**: 1106–1115.

- (100) Herrera Y., Okoh A., Alvarez L., Robledo N., Trejo-Hernandez M. R., Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by a Bacillus consortium. **2007**. *World journal of microbiology & biotechnology*, **24**: 55-60.
- (101) Emerson E., 1943. *Org. J. Chem.* **8**: 417- 428.
- (102) Svobodova D & Gasparie J., 1971. Investigation of the Colour Reaction of Phenols with 4-Aminoantipyrine. *Mikrochimica Acta.* **59**: 384-390.
- (103) Geng Z., BASSI A. S & Gijzen M., 2004. Enzymatic treatment of soils contaminated with phenol and chlorophenols using soybean seed hulls. *Water, Air, and Soil Pollution*, **154**: 151–166.
- (104) Farrell A., Quilty B., 2002. The enhancement of 2-chlorophenol degradation by a mixed microbial community when augmented with *Pseudomonas putida* CP1. *Water Research*, **36**: 2443–2450.
- (105) Lang E., Viedt H., 1994. Degradation by and toxicity to bacteria of chlorinated phenols and benzenes, and hexachlorocyclohexane isomers. *Microbial Ecology*, **28** : 53-65.
- (106) Djebbar k. E., 2002. Transformation directe et indirecte de deux Herbicides, le 2,4-D et le Diuron en solution aqueuse. *Thèse de Doctorat*. Université Mentouri (Constantine).
- (107) Joffin J.N., Leyral G., 2005. Microbiologie Technique. Tome 1 Dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, 171-189.
- (108) Guiraud J. P., 1998. Microbiologie Alimentaire. DUNOD, Paris, 219- 221.
- (109) Williams S. T & Cross T., 1971. Actinomycets In: Methods in microbiology. (BOOTH C. Ed). Acad. Press, London. **4**: 295-334.
- (110) Bae H. S., Yamagishi T., Suwa Y. 2002. Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. *Microbiology*, **148** : 221–227.
- (111) Spiegel M. R., 1972. Ajustement d'une courbe et méthode des moindres carrés. Dans Théorie et applications de la statistique. *Série SCHAUM*. New Yourk, **218**.
- (112) Hofrichter M, Bublitz F, Fritsche W., 1994. Unspecific degradation of halogenated phenols by the soil fungus *Penicillium frequentans* Bi 7/2. *Journal of Basic Microbiology*, **34**: 163-172.
- (113) Spain J. C, Gibson D. T., 1988. Oxidation of Substituted Phenols by *Pseudomonas putida* Fl and *Pseudomonas* sp. Strain JS6. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 1399-1404.
- (114) Kirchner U., Westphal A. H., Muller R., van Berkel W. J. H., 2003. Phenol Hydroxylase from *Bacillus thermoglucosidasius* A7, a Two-protein Component Monooxygenase with a Dual Role for FAD. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**: 47545–47553.

- (115) Gribble G W., 1996. The diversity of natural organochlorines in living organisms. *Pure and Applied Chemistry*, **68**: 1699-1712.
- (116) Milliken C. E., Meier G. P., Sowers K. R., May H. D., 2004. Chlorophenol Production by Anaerobic Microorganisms: Transformation of a Biogenic Chlorinated Hydroquinone Metabolite. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 2494–2496.
- (117) Jong E. D., Field J. A., 1997. Sulfur tuft and turkey tail: biosynthesis and biodegradation of organohalogens by basidiomycetes. *Annu. Rev. Microbiol*, **51**: 375-414.
- (118) Goswami M., Shivaraman N., Singh R. P., 2002. Kinetics of chlorophenol degradation by benzoate-induced culture of *Rhodococcus erythropolis* M1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **18**: 779–783.
- (119) Finkel'shtein Z. I., Baskunov B. P., Golovlev L., Moiseeva O. V., Vervoort J, Rietjens I., Golovleva A., 2000. Dependence of the conversion of chlorophenols by rhodococci on the number and position of chlorine atoms in the aromatic ring. *Microbiology*, **69**: 40-47.
- (120) Hofrichter M, Gunther T, Fritsche W., 1993. Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation*, **3**: 415-421.
- (121) Kharoune L., Kharoune M., Lebeault J. M., 2002. Aerobic degradation of 2,4,6 trichlorophenol by a microbial consortium: selection and characterization of microbial consortium. *Applied microbiology and biotechnology*, **59**: 112-117.
- (122) Tarighian A., Hill G., Headley J., Pedras S., 2003. Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **5**: 61–65.
- (123) Grady J. C., 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and Bioengineering*, **27**: 660–674.
- (124) Zaborina O. E., Baryshnikova L. M., Baskunov B. P., Golovlev E. L & Golovleva L. A., 1997. Degradation of Pentachlorophenol in Soil by the Introduced Strain *Streptomyces rochei* 303 and Activated Soil Microflora. *Mikrobiologiya*, **66**: 661-666.
- (125) Adams R. H., Huang C. M., Higson F. K., Brenner V., Focht D. D., 1992. Construction of a 3-chlorobiphenyl-utilizing recombinant from an intergeneric mating. *Appl. Env. Micro*, **58**: 647–654.
- (126) Haller H. D., Finn R. K., 1979. Biodegradation of 3-chlorobenzoate and formation of black color in the presence and absence of benzoate. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, **8**: 191–205.

- (127) **Knackmuss H. J., 1982.** Xenobiotic degradation in industrial sewage : Haloaromatics as target substrates. *Biochem. Soc. Symp*, **48** : 173–190.
- (128) **Fava F., Gioia D. D., Romagnoli C., Marchetti L., Mares D., 1993.** Biosynthesis and cytoplasmic accumulation of a chlorinated catechol pigment during 3-chlorobenzoate aerobic co-metabolism in *Pseudomonas fluorescens*. *Arch. Microbiol*, **160**: 350–357.
- (129) **Klecka G. M., Gibson D. T., 1981.** Inhibition of catechol 2,3-dioxygenase from *Pseudomonas putida* by 3-chlorocatechol. *Appl. Environ. Microbiol*, **41**: 1159–1165.
- (130) **Hollender J., Dott W & Hopp J., 1994.** Regulation of chloro- and methylphenol degradation in *Comamonas testosteroni* JH5. *Appl. Environ. Microbiol*, **60**: 2330–2338.
- (131) **Bartels I., Knackmuss H. J., Reineke W., 1984.** Suicide inactivation of catechol 2,3 dioxygenase from *Pseudomonas putida* mt-2 by 3-halocatechols. *Appl. Environ. Microbiol*, **47**: 500–505.
- (132) **Franklin R. B., Garland J. L., Bolster C. H., Mills A. L., 2001.** Impact of Dilution on Microbial Community Structure and Functional Potential: Comparison of Numerical Simulations and Batch Culture Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 702–712.
- (133) Water Quality. Ambient Water Quality Guidelines for Chlorophenols. 4. THE FATE OF CHLOROPHENOLS IN THE ENVIRONMENT. www.env.gov.bc.ca/wat/wq/BCguidelines/chlorophenols/bcchlorophenol-10.htm.
- (134) Directive 1999/13/CE du Conseil du 11 mars 1999 relative à la réduction des émissions de composés organiques volatils dues à l'utilisation de solvants organiques dans certaines activités et installations. *Journal officiel n° L 085 du 29/03/1999*. p : 0001 – 0022.
- (135) **Tarighian A., Hill G., Headley J., Pedras S., 2003.** Enhancement of 4-chlorophenol biodegradation using glucose. *Clean Technologies and Environmental Policy*, **5** : 61–65.
- (136) **Botton B et al., 1990.** Identification des moisissures. Dans *Moisissures, utiles et nuisibles, importance industrielle*. 2^{ème} Ed. Masson (Paris), 34 – 209.
- (137) **Polisch E., Kneifel H., Franzke H & Hofmann H. H., 1992.** Degradation and dehalogenation of monochlorophenols by the phenol-assimilating yeast *Candida maltosa*. *Biodegradation*, **2**: 193-199.
- (138) **Krug M., Zeigler H., & Straube G., 1985.** Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis* HP 15. *Journal of Basic Microbiology*, **25**: 103-110.
- (139) **Katayama-Hirayama K., Tobita S., Hirayama K., 1994.** Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*. *Water Science and Technology*, **30**: 59–66.

- (140) Hasegawa Y., Okamoto T., Obata H., & Tokuyama T., 1990. Utilization of aromatic compounds by *Trichosporon cutaneum* KUY-6A. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **69**: 122-124.
- (141) Hofrichter M & Scheibner K., 1993. Utilization of aromatic compounds by *Penicillium* Strain Bi 7 /2 isolated from contaminated soil. *Journal of Basic Microbiology*, **33**: 227-232.
- (142) Marr J., Kremer S., Sterner O., Anke H., 1996. Transformation and mineralization of halophenols by *Penicillium simplicissium* SK 9117. *Biodegradation*, **7**: 165-171.
- (143) Ledger T., Pieper D. H., Gonzalez B., 2006. Chlorophenol Hydroxylases Encoded by Plasmid pJP4 Differentially Contribute to Chlorophenoxyacetic Acid Degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**: 2783–2792.
- (144) Kharoune L., Kharoune M., Lebeault J. M., 2002. Aerobic degradation of 2,4,6 trichlorophenol by a microbial consortium : selection and characterization of microbial consortium. *Applied microbiology and biotechnology*, **59**: 112-117.
- (145) Buitron G., Gonzalez A., Lopez-Marin L. M., 1998. Biodegradation of phenolic compounds by an acclimated activated sludge and isolated bacteria. *Water Science and Technology*, **37** : 371-378.
- (146) Valat C., 2005. Développement d'outils biologiques pour le diagnostic Environnemental. *Thèse de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne Et Université Jean Monnet de Saint-Etienne*.
- (147) Chaerun S. K., Tazaki K., Asada R., Kogure K., 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the *Nakhodka* oil spill in the Sea of Japan : isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environ Int*, **30**: 911-922.
- (148) Kim S. B., Park C. H., Kim D. J., Jury W. A., 2003. Kinetics of benzene biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa* : parameter estimation. *Environ Toxicol Chem*, **22**: 1038-1045.
- (149) Choi J. Y., Sifri C. D., Goumnerov B. C., Rahme L. G., Ausubel F. M., Calderwood S. B., 2002. Identification of Virulence Genes in a Pathogenic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* by Representational Difference Analysis. *Journal of Bacteriology*, **184**: 952-961.
- (150) Walker T. S., Bais H. P., Déziel E., Schweizer H. P., Rahme L. G., Fall R., Vivanco J. M., 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiology*, **134** : 320-331.
- (151) http://en.wikipedia.org/wiki/P._putida.

Annexe 1. Milieux utilisés.

Milieu minimum

Mg SO ₄ 7 H ₂ O	0.112 (g/L)
Zn SO ₄ 7H ₂ O	0.005 (g/L)
Na ₂ Mo O ₄ 2H ₂ O	0.0025 (g/L)
KH ₂ PO ₄	0.34 (g/L)
Na HPO ₄	0.355 (g/L)
CaCl ₂	0.0186 (g/L)
Fe Cl ₃ 6H ₂ O	0.00022 (g/L)
KNO ₃	0.5 (g/L)

Milieu PIA

Peptone	20 (g/L)
Chlorure de magnésium	1,4 (g/L)
Sulfate de potassium	10 (g/L)
Ir gasan	0,025 (g/L)
Agar	13,6 (g/L)

-Dissoudre 45 g dans 980 ml d'eau distillées

-Ajouter 20 ml de Glycérol

-Porter à ébullition

- Stériliser

Annexe 2. Courbes étalons.

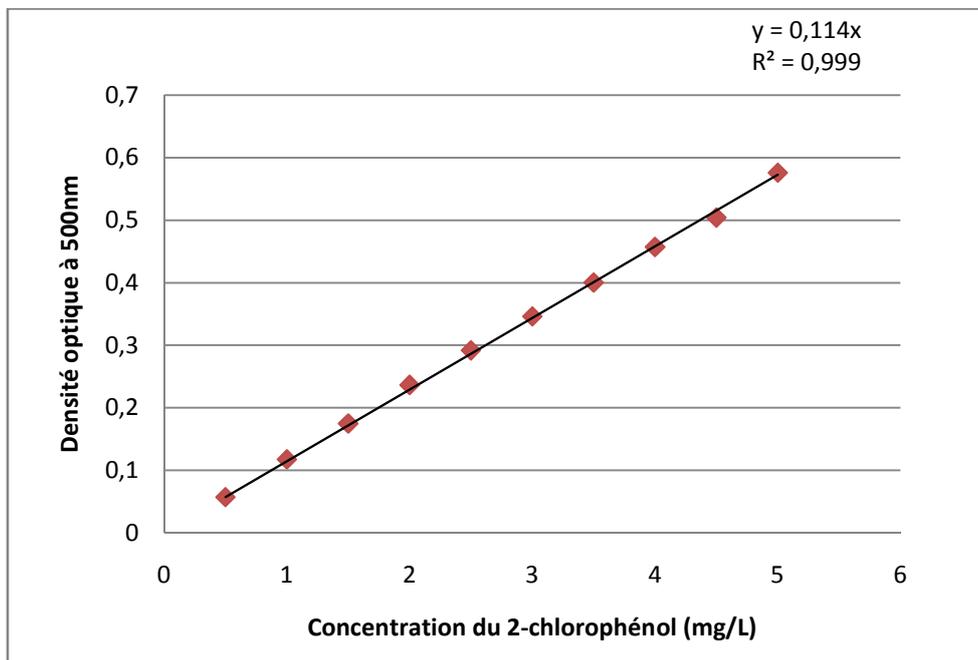


Figure 38. Courbe étalon du 2-chlorophénol.

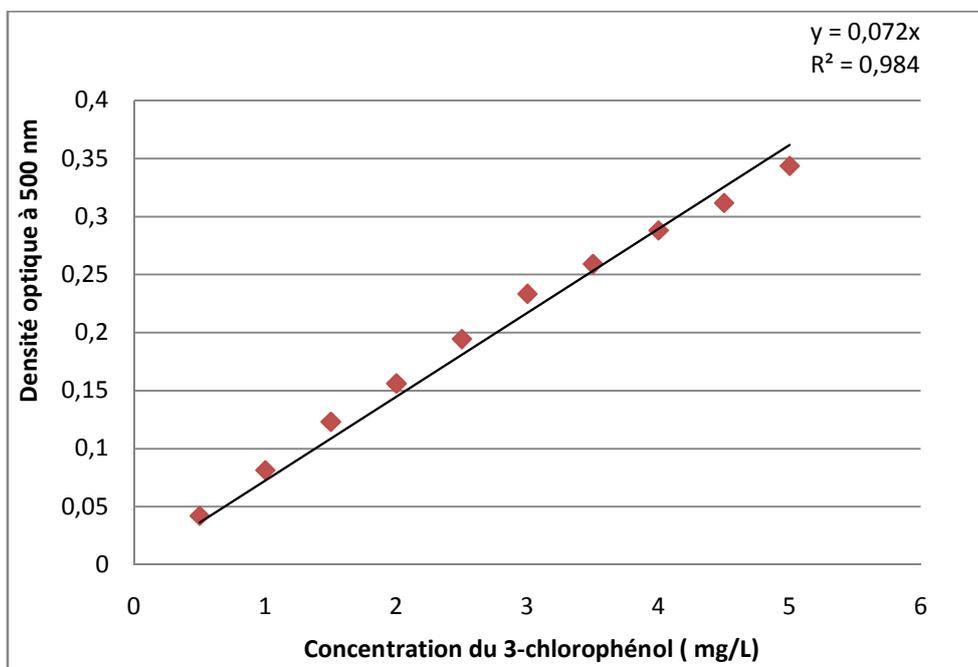


Figure 39. Courbe étalon du 3-chlorophénol.

Annexe 2. Courbes étalons (suite).

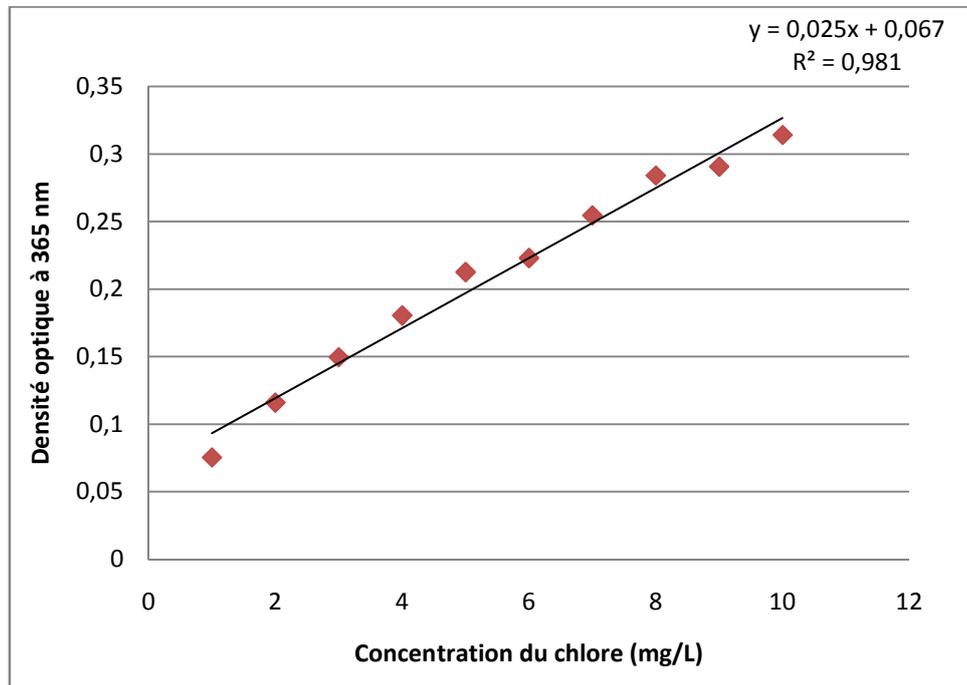


Figure 40. Courbe étalon de chlore.

Annexe 3.

Tableau 8. Tableau de lecture (API 20NE).

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup)	REACTION/ENZIMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	Potassium nitrate	0.136	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT2/5min	
			Réduction des nitrates en azote	incolore	rose-rouge
TRP	L-tryptophane	0.2	Formation d'indole (Tryptophane)	Zn/5min	
				Roze	incolore
GLU	D-glucose	1.92	Fermentation (GLUcose)	JAMES/immédiat	
				Incolore	rose
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange/rose/rouge
URE	Urée	0.76	URE ase	jaune	orange/rose/rouge
ESC	Esculine Citrate de fer	0.56 0.072	Hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)	jaune	Gris/marron/noir
GEL	Gétadine (origine bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase) (GELatine)	Pas de diffusion de pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl-βD-galactopyranoside	0.22	β-galactosidase (para-NitroPhény-βD-Galactopyranosidase)	incolore	jaune
GLU	D-glucose	1.56	Assimilation (Glucose)	transparance	trouble
ARA	L-arabinose	1.4	Assimilation (ARAbinose)	transparance	trouble
MNE	D-mannose	1.4	Assimilation (ManNosE)	transparance	trouble
MAN	D-mannitol	1.36	Assimilation (MANnitol)	transparance	trouble
NAG	N-acéty-glucosamine	1.28	Assimilation (N-acéty-glucosamine)	transparance	trouble
MAL	D-maltose	1.4	Assimilation (MALtose)	transparance	trouble
GNT	Potassium-gluconate	1.84	Assimilation(potassiumGlucoNate)	transparance	trouble
CAP	Acide caprique	0.78	Assimilation (acide CAPrique)	transparance	trouble
ADI	Acide adipique	1.12	Assimilation (acideADIpique)	transparance	trouble
MLT	Acide malique	1.56	Assimilation (MALate)	transparance	trouble
CIT	Trisodium citrate	2.28	Assimilation (trisodiumCITrate)	transparance	trouble
PAC	Acide phénylacétique	0.8	Assimilation (acide phénylacétique)	transparance	trouble

Annexe 4. Cinétiques de la dégradation.

Tableau 9. Cinétique de dégradation du 2-chlorophénol (mg/L).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
0 h	200,88	207,42	200,39	200,43	200	206,69	200	204,36	200,72	213,38	200
2 h	195,05	199,71	197,96	198,1	199,22	196,07	199,56	199,66	197,34	198,11	181,65
6 h	188,35	198,83	194,47	197,54	195,19	195,63	197,33	197,38	196,79	196,64	178,16
24 h	187,92	198,44	188,41	192,24	194,18	188,07	196,22	195,93	195,93	191,56	148,17
48 h	187,14	195,59	186,86	188,61	191,37	185,69	191,91	189,48	192,53	191,02	124,34
72 h	186,41	190,15	181,35	185,54	190,4	185,3	186,41	187,67	191,85	190,97	121,68
120 h	179,95	185	181,22	185,19	185,73	181,22	184,71	184,71	186,75	186,84	113,97
168 h	175,74	179,38	176,54	183,89	183,93	179,38	176,61	183,89	177,78	185,18	107,8
336 h	170,39	172,72	171,86	182,82	171,85	175,52	173,3	170,39	174,08	178,16	102,47
672 h	170,01	166,37	169,28	176,13	170,91	170,3	171,18	169,14	171,17	171,84	83,84
1344 h	162,3	158,85	165,46	176	170,3	169,14	170,13	170,3	170,38	169,14	68,99

Tableau 10. Cinétique de dégradation du 3-chlorophénol (mg/L).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
0 h	227,188082	233,240223	228,119181	218,808194	238,826816	215,549348	223,929236	224,860335	207,635009	209,962756	228,58473
2 h	212,756052	220,437616	217,411546	202,048417	233,938547	211,009348	212,290503	214,385475	206,936685	208,119181	222,998138
6 h	203,755431	213,299193	205,384854	197,712601	207,712601	206,567349	206,325264	209,342024	203,755431	197,489137	212,911235
24 h	191,60149	198,944755	193,153321	189,903786	194,103042	190,825574	199,671012	196,722533	199,205462	187,051521	205,152079
48 h	185,351955	181,860335	183,03352	172,09311	178,679702	174,430168	187,679702	183,024209	184,430168	171,143389	177,124767
72 h	174,859714	175,703911	160,291124	162,61887	152,997517	159,738672	167,290503	160,66977	178,875854	164,927995	166,617629
120 h	168,724084	150,595593	150,56766	145,251086	139,198945	142,001552	151,379578	144,319988	161,992241	141,768777	160,931409
168 h	156,543762	138,837368	137,716946	134,960894	129,320919	137,338299	142,751086	136,007449	154,855369	135,786468	155,827436
336 h	134,753445	126,770826	125,597641	122,959528	121,02905	120,631782	123,580261	127,993669	131,873246	121,339417	143,893358
672 h	116,188703	120,515208	119,981378	114,136561	118,429547	118,66915	117,032899	118,463687	122,878336	119,826195	127,715705
1344 h	114,882682	118,070143	119,653011	113,400993	113,227188	115,00807	115,054624	115,392303	118,587213	116,190565	115,719429

(Dil) Dilution, (Tps) Temps, (h) Heure, SM (Solution mère).

Annexe 5. Différentiel de libération de chlore.

Tableau 11. Différentiel de chlore libéré au cours de la dégradation du 2-chlorophénol (mg/L).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoins
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	0,54332	0,65048	0,47263	0,4923	0,63847	0,50808	0,5515	0,52497	0,71654	0,58638	0
336	0,85227	0,93578	0,79092	0,83691	0,9521	0,77767	0,76816	0,83204	1,1437	1,00173	0
672	0,9801	1,10696	0,8488	0,93537	1,07532	0,9332	0,89618	0,94099	1,25394	1,11168	0
1344	1,06533	1,14119	0,96454	0,9846	1,12012	1,03689	0,98482	0,99052	1,37796	1,22162	0

Tableau 12. Différentiel de chlore libéré au cours de la dégradation du 3-chlorophénol (mg/L).

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoins
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
168	4,3968	3,49745	3,20075	4,19275	3,80756	3,78317	4,73466	4,50545	4,21985	3,15679	0
336	6,89694	7,86927	5,98036	7,12767	7,35552	5,79057	7,35564	7,14071	6,73552	5,99789	0
672	8,44875	8,48133	7,83343	7,96622	8,30741	7,33472	7,69383	8,0758	7,46588	7,57629	0
1344	8,62118	8,74364	8,42304	8,38549	8,65355	7,72076	8,45476	8,50084	8,11509	7,89196	0

(Dil) Dilution, (Tps) Temps, (h) Heure, SM (Solution mère).

Annexe 6. Analyses statistiques.

Tableau 13. Effet de la dilution de l'inoculum sur la biodégradation du 2-CP (ANOVA).

	ddl	SC	MC	F	P
Variation factorielle	9	1395	155	0,37	0,948133
Variation résiduelle	320	133519	417		

Tableau 14. Effet de la dilution de l'inoculum sur la biodégradation du 3-CP (ANOVA).

	ddl	SC	MC	F	P
Variation factorielle	9	4098	455	0,251	0,986305
Variation résiduelle	320	580348	1814		

Tableau 15. Comparaison entre la dégradation biologique et abiotique du 2-CP (test student).

	Moyenne	Ec-Type	ddl	Différence	t	P
Biodégradation	185,5771	17,62694	32	55,47985	9,824812	0,000000
Dégradation abiotique	130,0973	44,60182				

Tableau 16. Comparaison entre la dégradation biologique et abiotique du 3-CP (test student).

	Moyenne	Ec-Type	ddl	Différence	t	P
Biodégradation	166,6023	40,77080	32	-7,71368	-3,36560	0,00199
Dégradation abiotique	174,3160	41,38908				

(**SC**) Somme des carrés, (**MC**) Somme des carrés moyens, (**ddl**) Degrés de liberté, (**F**) Statistique du test Fischer, (**t**) Statistique du test student, (**p**) Probabilité attachée à la valeur de Fischer ou à la valeur de Student.

Annexe 7. Variation du pH au cours de la dégradation des molécules substrats.

Tableau 17. Variation du pH au cours de la dégradation du 2-chlorophénol.

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
0 h	6,86	6,81	6,80	6,78	6,89	6,89	6,85	6,82	6,86	6,79	6,79
2 h	6,77	6,76	6,76	6,76	6,77	6,76	6,76	6,76	6,77	6,77	6,76
6 h	6,76	6,79	6,77	6,74	6,74	6,75	6,75	6,75	6,80	6,80	6,78
24 h	6,63	6,63	6,69	6,67	6,71	6,73	6,70	6,72	6,80	6,83	6,78
48 h	6,78	6,79	6,81	6,82	6,84	6,85	6,84	6,84	6,80	6,83	6,82
72 h	6,83	6,78	6,80	6,86	6,83	6,85	6,85	6,84	6,88	6,86	6,86
120 h	6,82	6,91	6,89	6,87	6,85	6,82	6,81	6,83	6,82	6,76	6,83
168 h	6,79	6,88	6,89	6,80	6,81	6,78	6,82	6,83	6,85	6,74	6,85
336 h	6,80	7,01	6,84	6,81	6,80	6,79	6,87	6,89	6,82	6,72	6,80
672 h	6,89	6,88	6,77	6,78	6,78	6,74	6,80	6,84	6,81	6,71	6,82
1344 h	6,83	8,80	6,75	6,67	6,82	6,76	6,72	6,84	6,80	6,75	6,79

Tableau 18. Variation du pH au cours de la dégradation du 3-chlorophénol.

Tps/Dil	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	SM	Témoin
0 h	6,82	6,85	6,92	6,86	6,88	6,84	6,84	6,88	6,86	6,93	6,84
2 h	6,86	6,84	6,83	6,84	6,84	6,69	6,75	6,75	6,76	6,69	6,84
6 h	6,94	6,91	6,94	6,93	6,93	6,85	6,87	6,87	6,82	6,84	6,84
24 h	6,91	6,90	6,92	6,91	6,91	6,81	6,85	6,79	6,79	6,81	6,80
48 h	6,88	6,88	6,96	6,90	6,91	6,87	6,90	6,87	6,87	6,84	6,87
72 h	6,92	6,92	6,89	6,91	6,91	6,87	6,84	6,74	6,67	6,61	6,90
120 h	6,84	6,95	6,90	6,89	6,91	6,83	6,74	6,77	6,84	6,86	6,93
168 h	6,93	6,95	6,93	6,94	6,94	6,83	6,95	6,93	6,83	6,98	6,87
336 h	6,82	6,76	6,73	6,77	6,75	6,79	6,88	6,76	6,82	6,75	6,84
672 h	6,93	6,96	6,88	6,93	6,92	6,91	6,99	6,92	6,77	6,74	6,88
1344 h	6,81	6,81	6,77	6,80	6,79	6,92	6,75	6,74	6,65	6,66	6,88

(Dil) Dilution, (Tps) Temps, (h) Heure, SM (Solution mère).

Annexe 8. Résultats d'identification sur galerie API 20 NE.

Tableau 19. Résultats d'identification des espèces bactériennes sur galerie API 20 NE.

Test/Souche	B1	B2	B3
NO ₃	+	-	+
TRP	-	-	-
GLU	-	-	-
ADH	+	+	-
URE	+	+	-
ESC	-	-	+
GEL	+	-	+
PNG	-	-	+
GLU	+	+	+
ARA	-	-	+
MN	-	-	+
MAN	+	-	+
NAG	+	-	+
MAL	-	-	+
GNT	+	+	+
CAP	+	+	-
ADI	+	-	-
MLT	+	+	+
CIT	+	+	+
PAC	-	+	-
OX	+	+	-
Profil numérique	1354575	0340457	1477741
Identification	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>

Résumé :

La biodégradation du **2- et 3-chlorophénol** par le microbiote tellurique de la plaine d'EL Harrouch est étudiée. L'isolement et l'identification des souches dominantes responsables de la dégradation sont parallèlement effectués.

L'évaluation de la biodégradation est réalisée par : le dosage de la concentration des deux isomères par **la technique colorimétrique du 4-AAP**, le dosage par **turbidimétrie** de chlore libéré au cours de la biodégradation, et en fin l'éventuelle production de gaz. L'isolement des souches dominantes est effectué par **la technique de la dilution-extinction** sur milieu liquide. L'identification des souches bactériennes est réalisée à l'aide du **système API-biomérieux** alors que celle des moisissures est effectuée par **l'étude des caractères morphologiques** macroscopiques et microscopiques.

Les cinétiques de dégradation des deux isomères montrent que la biodégradation continue jusqu'à la fin des deux mois avec des taux de dégradation moyens de **17,27%** et **47, 86%** en 2- et 3-chlorophénol respectivement. La vitesse de biodégradation du 3-chlorophénol est **3 à 4** fois plus importante que celle de son isomère selon les différentes dilutions. La biodégradation commence avec des vitesses moyennes instantanées de l'ordre de **2,5** et **8,71 mg/L*h** pour le 2- et le 3-chlorophénol respectivement à $t = 2$ h. Cependant, les vitesses de biodégradation décèlent considérablement en fonction du temps jusqu'à ce qu'elles deviennent remarquablement faible. Aucune production de gaz n'est enregistrée sur toute la période d'incubation, de plus, la libération non stœchiométrique du chlore au cours de la biodégradation des monochlorophénols étudiés prouve que leur biodégradation n'est pas complète. Autrement dit les deux isomères ne se sont pas complètement minéralisés mais biotransformés en métabolites chlorés. Une coloration marron apparue dans le milieu de culture est probablement le résultat de la polymérisation de ces derniers.

Trois souches bactériennes isolées et purifiées sur milieu GN se sont montrées aérobies strictes, de forme bacillaire et à coloration de Gram négative. Les trois souches sont identifiées comme étant : *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* et *Chryseomonas luteola*. La biodégradation des monochlorophénols étudiés est probablement due en majeure partie à l'action de ces espèces bactériennes.

Mots-clés : Biodégradation, monochlorophénols, dosage de chlore, xénobiotiques, pollution du sol.

Abstract

The biodegradation of 2 - and 3-chlorophenol by the telluric microbiota of the plain of EL Harrouch is studied. The isolation and the identification of dominant strains responsible for the degradation are conducted in parallel.

The evaluation of biodegradation is done by the determination of the concentrations of the two isomers by 4-AAP method and the measurement of chlorine release and gas production during the degradation. The isolation of dominant strains is done by dilution-extinction method and the identification of bacterial strains is performed using the API systeme while mold is identified after morphological studies.

The kinetic of degradation of the two isomers shows that the degradation continues until the end of the two months with 17.27% and 47, 86% of 2 - and 3-chlorophenol degraded at the end of the study. The biodegradation of 3-chlorophenol is 3 to 4 times greater than its isomer according to the different dilutions. Biodegradation begins with instant speeds of about 2.5 and 8.71 mg / L * h for 2 - and 3-chlorophenol respectively at t = 2 h. However, the speed of biodegradation decrease considerably with time. No gas production is recorded throughout the incubation period and the non-stoichiometric release of chlorine during the biodegradation of monochlorophenols studied prove that their biodegradation is not complete. They may be transformed into chlorinated metabolites wich polimerisation produce A brown color in the medium. Three bacterial strains isolated and purified are identified as: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* and *Chryseomonas luteola*. Biodegradation is probably the action of bacterial species.

Key-words: Biodegradation, monochlorophenols, chlorine dosage, xenobiotics, soil pollution.

ملخص:

تمت دراسة الهدم الحيوي لجزيئات 2 و 3-كلوروفينول من قبل مكروبات عينة من تربة سهل الحروف، بالتوازي مع عملية عزل وتحديد السلالات السائدة المسؤولة عن الهدم.

تم تقييم الهدم الحيوي ب : تحديد تركيز الايزومرين بتقنية القياس اللوني 4 - أنب، قياس كمية الكلور الناتجة عن عملية الهدم الحيوي، و أخيراً ترقب الناتج المتوقع للغاز. اجري عزل السلالات السائدة بتقنية التخفيف في وسط سائل. تعريف السلالات البكتيرية تم باستعمال تضام أب.إ-بيومريو، أما الفطر المكروسيكوبي فدراسة الخصائص المورفولوجية الماكروسيكوبية و المكروسيكوبية.

منحنى هدم كل من الايزومرين يبين أن الهدم الحيوي يستمر حتى نهاية الشهرين مع معدلات هدم متوسطة مقدرة ب: 17.27 % و 47.86 % لكل من 2 و 3-كلوروفينول على الترتيب. سرعة الهدم الحيوي لجزيئات 3-كلوروفينول أكبر 3 إلى 4 مرات من سرعة الهدم الحيوي لجزيئات 2 - كلوروفينول وفقاً لمختلف الخفيفات. ينطلق الهدم الحيوي بسرعة متوسطة أنية مقدرة بنحو 2.5 و 8.71 ملغ / لتر.سا لكل من 2 و 3-كلوروفينول على الترتيب عند $z=2$ سا، إلا أن سرعة الهدم الحيوي تتباطأ بصفة ملحوظة بدلالة الزمن إلى أن تصبح جُبطيئة. لم يسجل أي إنتاج للغاز طوال فترة الحضان، بالإضافة إلى ذلك، يدل التحرير غير المتكافئ للكلور خلال عملية الهدم الحيوي للأحادي-كلوروفينول المدروسة أن الهدم الحيوي غير تام. وبعبارة أخرى فإن كلا الايزومرين لم يتم هدمها كلياً بل تعرضا لعملية هدم جزئي نتج عنها وسائط كلورية. اللون البني الظاهر في الوسط قد يكون ناتج عن تبلور هذه الأخيرة.

ثلاثة سلالات بكتيرية معزولة ومنقاة في وسط جيلوزي مخذي ثبت أنها على شكل عصيات سلبية لون الغرام و ذات تنفس هوائي. عرفت السلالات الثلاث كما يلي:

Chryseomonas luteola و *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*

يبين أن الهدم الحيوي هو الوضيفة الرئيسية للأصناف البكتيرية.

الكلمات المفتاحية : الهدم الحيوي، 2 - كلوروفينول، 3-كلوروفينول، تلوث التربة.

<p>Nom: GUENOUNE</p> <p>Prénom: Salima</p>	<p>Date de soutenance 10/05/2009.</p>
<p align="center"><u>Thème:</u> Biodégradation de monochlorophénols par le microbiote tellurique de la plaine d'El Harrouch.</p>	
<p><u>Résumé:</u></p> <p>La biodégradation cinétique du 2- et 3-chlorophénol par le microbiote tellurique de la plaine d'EL Harrouch est étudiée, parallèlement à l'isolement et l'identification des souches dominantes responsables de la dégradation.</p> <p>L'évaluation de la biodégradation est réalisée par : le dosage de la concentration des deux isomères par la technique colorimétrique du 4-AAP, le dosage par turbidimétrie du chlore libéré au cours de la biodégradation, et en fin, l'éventuelle production de gaz. L'isolement des souches dominantes est effectué par la méthode de la dilution-extinction sur milieu liquide. L'identification des souches bactériennes est réalisée à l'aide du système API-bioMérieux alors que celle des moisissures est effectuée par l'étude des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.</p> <p>Les cinétiques de dégradation des deux isomères montrent que la biodégradation continue jusqu'à la fin des deux mois de mesure, avec des taux de dégradation moyens de 17,27% et 47, 86% en 2- et 3-chlorophénol respectivement. La vitesse de biodégradation du 3-chlorophénol est 3 à 4 fois plus importante que celle de son isomère, selon les différentes dilutions. La biodégradation commence avec des vitesses moyennes instantanées de l'ordre de 2,5 et 8,71 mg/L*h pour le 2- et le 3-chlorophénol respectivement à $t = 2$ h. Cependant, les vitesses de biodégradation décèlent considérablement en fonction du temps jusqu'à ce qu'elles deviennent remarquablement faible. Aucune production de gaz n'est enregistrée sur toute la période d'incubation. De plus, la libération non stœchiométrique du chlore au cours de la biodégradation des monochlorophénols étudiés prouve que leur biodégradation n'est pas complète. Autrement dit les deux isomères ne sont pas complètement minéralisés mais biotransformés en métabolites chlorés. Une coloration marron apparaît dans le milieu de culture et résulte probablement de la polymérisation de ces dérivés chlorés. Trois souches bactériennes isolées et purifiées sur gélose nutritive sont aérobies stricte, de forme bacillaire et à coloration de Gram négative. Les trois souches sont identifiées comme étant : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Pseudomonas putida</i> et <i>Chryseomonas luteola</i>. La biodégradation des monochlorophénols étudiés est probablement due en majeure partie à l'action de ces espèces bactériennes.</p>	
<p><u>Mots-clés :</u> Biodégradation, monochlorophénols, dosage de chlore, xénobiotiques, pollution du sol.</p>	
<p><u>Laboratoire de recherche :</u> Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications.</p>	
<p><u>Membres du jury :</u></p> <p>Mr. BOULAHROUF A. Professeur à l'université de Constantine. Mr. BOUSSEBOUA H. Professeur à l'université de Constantine. Mr. RAHMOUNE C. Professeur à l'université de Constantine. Mr. HAMIDECHI M A. Maitre de conférences à l'université de Constantine</p>	