

# 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 et de Microbiologie

N° d'ordre:.....

N° de série:.....

## Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magister en Microbiologie appliquée  
et Biotechnologies microbiennes.

Par: **NOUMEUR SARA RAOUIA**

### THÈME

## **Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna)**

Soutenu le :27 october 2008

### Devant le Jury:

<b>Président:</b>	MERAIHI Z.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.
<b>Rapporteur:</b>	BOUSSEBOUA H.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.
<b>Examineurs:</b>	DJEBBAR K.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. Chimie.
	BOULAHROUF A.	Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.
	HAMIDECHI A.	M.C. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.

Année universitaire 2008/2009

*A la mémoire  
de mon père SADDEK*

## Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu de nous avoir offert tous ce que nous possédons.

Je suis très heureuse de pouvoir exprimer ma profonde gratitude à Monsieur BOUSSEBOUA H. Professeur à l'université Mentouri de Constantine pour avoir accepté d'être mon directeur de thèse, pour ses conseils précieux, pour sa grande disponibilité et son dévouement pour la recherche scientifique qui ont grandement contribué à l'élaboration de ce travail.

Je suis très honorée et tiens à remercier les membres du jury:

Mme. MERAIHI Z. Professeur à l'université Mentouri de Constantine pour l'honneur qu'elle me fait en président cet honorable jury.

M. DJEBBAR K. Professeur à l'université Mentouri de Constantine, M. BOULAHROUF A. Professeur à l'université Mentouri de Constantine et M. HAMIDECHI A. Maitre de conférence à l'université Mentouri de Constantine d'avoir accepté d'examiner ce travail et faire partie du jury.

Mes remerciements à M. ABDEDAIM M. Maitre de conférence à l'université El Hadj Lakhdar de Batna qui n'a épargné aucun effort pour m'apporter aide et assistance.

Je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, surtout mes collègues du laboratoire.

# SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
1. Le sol.....	3
1.1 Définition.....	3
1.2. Caractéristiques générales des phases du sol.....	3
1.2.1. La phase solide du sol.....	3
- Fraction minérale.....	3
- Fraction organique.....	4
• Microflore du sol.....	5
▪ Bactéries.....	5
▪ Champignons.....	5
▪ Algues et protozoaires.....	5
1.2.2. La phase liquide du sol.....	6
1.2.3. La phase gazeuse du sol.....	6
1.3. Pollution des sols.....	7
1.3.1. Définitions.....	7
1.3.2. Les formes de pollution.....	7
1.3.3. Micropolluants des sols.....	8
- Micropolluants inorganiques.....	8
- Micropolluants organiques.....	8
• Polychlorobiphényles PCB.....	8
• Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	9
• Les composés organiques volatils (COV).....	9
• Phénols et dérivés.....	9
• Pesticides.....	10
1.4. Devenir des polluants organiques dans le sol.....	10
1.4.1. Rétention des composés organiques xénobiotiques.....	11
- Adsorption.....	11
- Volatilisation.....	12
1.4.2. Dégradation.....	12
- Dégradation abiotique.....	12
• Hydrolyse.....	12

• Les réactions de réduction et d'oxydation.....	12
• Les réactions de dégradation photochimique.....	12
- Dégradation biologique.....	13
<b>2. Le 2,4-dichlorophénol.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Généralités.....</b>	<b>15</b>
2.1.1. Structure et propriétés chimiques de 2,4-dichlorophénol.....	15
2.1.2. Propriétés physiques.....	15
<b>2.2. Principe de production.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. Utilisation.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4. Toxicité.....</b>	<b>16</b>
2.4.1. Toxicité aigue.....	16
2.4.2. Toxicité chronique.....	16
<b>2.5. Caractérisation de la pénétration de 2,4-dichlorophénol dans l'environnement.....</b>	<b>16</b>
2.5.1. Air.....	18
2.5.2. Eau.....	18
2.5.3. Sol.....	18
<b>2.6. Devenir de 2,4-dichlorophénol dans l'environnement.....</b>	<b>18</b>
2.6.1. Dynamique.....	19
- Dans le sol.....	19
- Dans l'eau.....	19
- Dans le sol.....	19
<b>2.7. Rémanence dans le milieu.....</b>	<b>21</b>
2.7.1. Dégradation abiotique.....	21
2.7.2. Dégradation biotique.....	21
- Dégradation aérobie.....	21
- Dégradation anaérobie.....	23
<b>2.8. Bioaccumulation du 2,4-dichlorophénol dans les organismes vivants.....</b>	<b>23</b>
2.8.1. Pantes.....	23
2.8.2. Organismes aquatiques.....	23
<b>Chapitre II: Matériel et méthodes</b>	
<b>1. Milieu de culture.....</b>	<b>24</b>
<b>2. Inoculum.....</b>	<b>24</b>
2.1. Prélèvement de sol.....	24
2.2. Préparation de la suspension de sol.....	24
2.3. Préparation des dilutions décimales.....	24

<b>3. Cinétique de la biodégradation.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Conditions de culture.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Méthode de dosage du 2,4-dichlorophénol.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3. Dosage de l'ion chlorure.....</b>	<b>25</b>
<b>4. Isolement et purification de souches microbiennes responsables de la biodégradation.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1. Confirmation de la capacité des souches à dégrader le 2,4-dichlorophénol.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2. Identification.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.1. Souche fongique.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.2. Souche bactérienne.....</b>	<b>26</b>
<b>a. Observation microscopique.....</b>	<b>26</b>
<b>b. Caractères biochimiques et physiologiques .....</b>	<b>27</b>
- Type respiratoire.....	27
- Recherche de la cytochrome oxydase.....	27
- Hydrolyse de la cellulose.....	27
- Recherche de la nitrate réductase.....	27
- Production d'indole.....	28
- Mise en évidence de la production de pigments spécifiques.....	28
<b>5. Analyse statistique.....</b>	<b>28</b>
<b>Chapitre III: Résultats et discussion</b>	
<b>1. Qualité de l'échantillon de sol.....</b>	<b>31</b>
<b>2. Cinétique de biodégradation du 2,4-dichlorophénol.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Cinétique de libération de l'ion chlorure.....</b>	<b>38</b>
<b>4. Isolement et identification de souches responsables de la dégradation.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. Observation microscopique.....</b>	<b>40</b>
- Souche fongique.....	40
- Souches bactériennes.....	40
<b>4.2. Critères biochimiques et physiologiques des souches bactériennes isolées.....</b>	<b>40</b>
- Type respiratoire.....	40
- Recherche de la cytochrome-oxydase.....	40
- Hydrolyse de la cellulose.....	40
- Recherche de la nitrate réductase.....	41
- Production d'indole.....	41
- Mise en évidence de la production de pigments spécifiques.....	41
<b>Discussion générale et conclusion.....</b>	<b>42</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>45</b>

## Liste des abréviations

- 2,4,5-T** : Acide 2,4,5-trichlorophénoxyacétique.
- 2,4-D** : Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique.
- 2,4-DCP** : 2,4-dichlorophénol.
- 2,4-DP** : acide 2-(2,4-dichlorophenoxy) propionique.
- 3,4-DCC** : 3,5-dichlorocathéchol.
- 3,5-DCG** : 3,5-dichloroguaiacol.
- 4,6-DCG** : 4,6-dichloroguaiacol.
- 4-AAP** : 4-aminoantipyrine.
- ANOVA** : Analyse de la variance.
- BCF** : Facteur de la bioconcentration.
- CHQ** : Chlorohydroquinone.
- CM** : Somme des carrés moyens.
- COV** : Composés organiques volatils.
- ddl** : Degré de liberté.
- Dil** : Dilution.
- HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.
- HQ** : Hydroquinone.
- K<sub>ow</sub>** : Coefficient de partage (n-octanol/eau).
- ORL** : Oto-rhino-laryngologie.
- PCB** : Polychlorobiphényles.
- PCP** : Polychlorophénols.
- SC** : Somme des carrés.
- T** : Témoin.
- UE** : Union européenne.
- US-EPA** : Agence de Protection de l'Environnement des Etats Unis.
- VF** : Viande-fois.

## Liste des figures et des tableaux

- Figure 1.** Structure chimique de 2,4-dichlorophénol.
- Figure 2.** Formation de 2,4-DCP à partir de 2,4-D.
- Figure 3.** Voie proposée de la minéralisation du 2,4-dichlorophénol.
- Figure 4.** Voie proposée de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol par *Mortierella* sp.
- Figure 5.** Schéma de biodégradation anaérobie du 2,4-dichlorophénol.
- Figure 6.** Cinétique de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol.
- Figure 7.** Changement de couleur du milieu de culture.
- Figure 8.** Cinétique de la dégradation du 2,4-DCP dans le témoin stérile.
- Figure 9.** Différence de la cinétique de dégradation biotique et abiotique.
- Figure 10.** Cinétique de la libération de l'ion chlorure pendant la biodégradation (Inoculum non dilué -  $10^{-9}$ ).
- Figure 11.** Cinétique de la libération de l'ion chlorure dans les fermenteurs stériles.
- Figure 12.** Aspect microscopique des souches microbiennes isolées.
- Figure 13.** Spectre d'absorbance du 2,4-dichlorophénol (Concentration =  $5\mu\text{g/ml}$ ).
- Figure 14.** Courbe étalon du 2,4-dichlorophénol.
- Figure 15.** Courbe étalon de l'ion chlorure.
- Tableau 1.** Distribution des microorganismes en fonction du sol.
- Tableau 2.** Propriétés physico-chimiques du 2,4-dichlorophénol.
- Tableau 3.** Cinétique de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol (concentrations et pH).
- Tableau 4.** Pourcentages de la dégradation du 2,4-dichlorophénol.
- Tableau 5.** Cinétique de la libération de l'ion chlorure.
- Tableau 6.** ANOVA pour tester l'effet de la dilution sur la biodégradation
- Tableau 7.** Test de student pour comparer la dégradation biotique et abiotique

# Introduction

Le sol est un milieu fragile et très complexe, trop longtemps considéré comme un simple support de l'agriculture. C'est un milieu vivant, interface entre la biomasse, l'atmosphère et l'hydrosphère. Le sol joue un rôle prépondérant dans le déterminisme de la qualité des eaux, de l'air et de la chaîne alimentaire. C'est aussi un milieu de transit, de stockage et de transport de nombreuses substances, quelle que soit leur nature, organique ou inorganique, résultant de processus naturels ou d'activités domestiques (1). La pollution des sols et des sous sols résulte des conséquences cumulées de diverses activités humaines, tant industrielles qu'agricoles et urbaines. Cette contamination, trop négligée jusqu'à une époque récente, est préoccupante par ses conséquences environnementales, sanitaires et socio-économiques.

Les chlorophénols sont des phénols chlorés, communément présents dans les pesticides et de multiples produits et résidus. Ils sont aussi générés comme sous produits dans la dégradation des acides phénoxyalkaloïques par les microorganismes, certaines plantes et des animaux. La pollution de l'environnement par les chlorophénols pose de sérieux problèmes du fait de leur rémanence dans le milieu et de leur toxicité. En particulier le 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP), polluant chlorophénolique le plus fréquemment rencontré dans l'environnement, inclus depuis longtemps dans la liste des polluants majeurs par la l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats Unis (US-EPA) et par l'Union européenne (UE) (2). Le 2,4-dichlorophénol est largement utilisé dans la production de pesticides, la préservation du bois et autres applications industrielles. Dans le sol, le 2,4-DCP résulte de la dégradation photolytique et biologique du 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) et de son accumulation par l'apport des eaux usées polluées.

La prédiction de la persistance et la concentration de composés toxiques dans l'environnement, de même que l'évaluation du risque écologique exigent des informations sur leur cinétique de biodégradation (3). L'étude de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol dans le sol est essentielle pour déterminer son potentiel polluant et donc son impact sur l'environnement. Un grand nombre de méthodes physiques, chimiques et biologiques sont utilisées pour éliminer les chlorophénols à partir de sites pollués. Ces méthodes ont prouvé leur efficacité mais elles peuvent générer des sous produits indésirables, en plus elles deviennent de plus en plus chères. Par contre, les méthodes biologiques sont généralement plus efficaces et relativement moins chères que les méthodes chimiques (4).

Plusieurs auteurs ont étudié la biodégradation du 2,4-dichlorophénol en aérobiose par un consortium de microorganismes (3, 4, 5, 6, 7) ou par des souches microbiennes pures (2, 8, 9, 10, 11) mais en milieu aqueux. Notre travail s'inscrit dans ce contexte global et concerne en particulier l'étude de la cinétique de biodégradation du 2,4-dichlorophénol mais par le microbiote tellurique d'un sol agricole particulièrement exposé à la présence du 2,4-D. Ce substrat est utilisé dans notre étude comme seule source de carbone et d'énergie. Un essai d'identification de groupements microbiens impliqués dans ce phénomène est également effectué.

# Synthèse bibliographique

# 1. Le sol

## 1.1. Définition

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Leur ensemble, dénommé pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (12).

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (13).

## 1.2. Caractéristiques générales des phases du sol

Le sol est constitué de trois phases : solide, liquide et gazeuse. Leurs proportions sont variables en fonction, notamment, de leur état hydrique et des contraintes mécaniques qu'ils subissent.

### 1.2.1. La phase solide du sol

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides (1). On distingue deux fractions dans le sol:

#### - Fraction minérale

Les minéraux constituent, en général, de 95 à 99% du sol. La composition minérale dépend de la nature de la roche-mère. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques différentes (13) :

- Sable ( $\varnothing = 2000$  à  $50 \mu\text{m}$ )
- Limon ( $\varnothing = 50$  à  $2 \mu\text{m}$ )
- Argile granulométrique ( $\varnothing < 2\mu\text{m}$ )

La texture d'un sol correspond à la répartition des minéraux par catégorie de grosseur, indépendamment de la nature et de la composition de ces minéraux. Les sols sont classés suivant leurs proportions relatives en particules argileuses, limoneuses et sableuses (12).

### - Fraction organique

La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (14). On trouve aussi des organismes vivants : des bactéries dont beaucoup d'actinomycètes, des champignons et une microfaune formée de protozoaires, nématodes, insectes, vers de terre (13).

Le sol est un habitat généralement favorable à la prolifération des microorganismes, leur nombre est supérieur à celui trouvé dans les eaux douces ou marines : la population microbienne s'élève à des valeurs comprises entre  $10^6$  et  $10^9$  bactéries par gramme de sol (15). Leur abondance et leur nature dépendent du type de sol, de la végétation, du climat et des diverses actions anthropiques et de leurs variations (1). La profondeur est une variable écologique qui affecte significativement la survie des microorganismes. Dans les zones tempérées, si une grande partie d'entre eux se concentre dans le premier mètre de la couche superficielle, ce sont en fait les premiers centimètres qui en contiennent le plus grand nombre (16) (tableau 1). Les bactéries et les champignons constituent les microorganismes les plus représentés dans les sols où ils sont les principaux responsables de la minéralisation des matières organiques (13). Ils participent aussi à un processus appelé humification qui conduit à la formation de l'humus (14) qui est un composé complexe et majeur du cycle de la matière organique tellurique et de la fertilité du sol.

**Tableau 1.** Distribution des microorganismes en fonction du sol (17)

Profondeur (cm)	Organismes/g de sol $\times 10^3$				
	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	Champignons	Algues
<b>3-8</b>	7800	1950	2080	119	25
<b>20-25</b>	1800	379	245	50	5
<b>35-40</b>	472	98	49	14	0,5
<b>65-75</b>	10	1	5	6	0,1
<b>135-145</b>	1	0,4	-	3	-

- **Microflore du sol (18)**

La microflore du sol est formée de bactéries (Archéobactéries et Eubactéries), de champignons (levures et moisissures), d'algues et de protozoaires.

- **Bactéries**

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies. On estime d'ailleurs que tous les groupes de bactéries connus pourraient être isolés d'un échantillon du sol, si les techniques et les milieux adéquats sont utilisés. Ce qui ne signifie pas que le sol soit le milieu naturel de toutes les bactéries. Par sa nature de milieu ouvert et sensible aux facteurs de l'environnement, le sol est le réceptacle d'apport continu de microorganismes exogènes qui disparaissent ou survivent en situation de dormance, en raison des conditions défavorables d'un milieu qui n'est pas le leur. Mais certains d'entre eux peuvent ponctuellement s'implanter. Les bactéries du sol sont à dominante GRAM positif, avec comme groupes principaux : les Corynébactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes. Les genres les plus communément isolés sont *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies. Les variations du potentiel nutritionnel du sol favorisent l'apparition de bactéries autotrophes du cycle de l'azote : *Nitrosomonas* et *Nitrobacter* et du soufre : *Thiobacillus*.

- **Les champignons**

En général, les champignons du sol forment une biomasse aussi importante que celle des bactéries. Leurs activités métaboliques sont multiples et fondamentales à l'équilibre écologique des sols, par : leurs interactions avec les systèmes racinaires des plantes, leur aptitude de colonisation et de dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexes. De nombreux travaux indiquent la prédominance de : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés.

- **Algues et protozoaires**

Les algues sont considérées comme relativement peu abondantes dans le sol. Mais leur présence est cependant commune. Les algues du sol incluent des espèces coccoïdes ou filamenteuses.

Les groupes les plus courants sont des Chlorophyceae. Parmi les microorganismes photosynthétiques du sol, les Cyanobactéries sont dominantes dans les sols neutres et alcalins, alors que les algues sont les plus communes dans les sols acides.

Les protozoaires isolés des sols sont variés et se développent dans les zones superficielles humides, au niveau des films d'eau entourant les particules.

### 1.2.2. La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable. On la désigne par l'expression « solution du sol ». Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisées et non. D'une façon générale, la solution du sol est difficile à décrire et à étudier en raison de sa très grande variabilité spatiale et temporelle, de sorte qu'il n'existe pas de composition type. On peut cependant donner quelques indications générales en distinguant deux catégories de solutés:

- Les micro-éléments dont la concentration est inférieure à  $1 \text{ mmol/m}^3$ , beaucoup d'éléments traces métalliques entrent dans cette catégorie.
- Les macro-éléments dont la concentration est supérieure à cette limite; les éléments les plus fréquents et les composés chimiques correspondants sont: C ( $\text{HCO}_3^-$ ), N ( $\text{NO}_3^-$ ), Na ( $\text{Na}^+$ ), Mg ( $\text{Mg}^{2+}$ ), Si ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ), S ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), Cl ( $\text{Cl}^-$ ), K ( $\text{K}^+$ ), Ca ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et  $\text{O}_2$ .

La solution du sol est principalement une solution d'électrolytes, généralement peu concentrée et dont la molarité totale est souvent de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  mol/L. Elle contient également des ions  $\text{H}^+$  et  $\text{OH}^-$  dont les concentrations déterminent la réaction du sol caractérisée par le pH (1).

### 1.2.3. La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol. Sa composition est souvent 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 proximité de l'atmosphère, c'est-à-dire la profondeur dans le sol et l'activité biologique.

L'air du sol contient en général les mêmes substances que l'air atmosphérique mais sa composition peut être très différente en raison, en particulier, de l'activité biologique (19). Les sols bien aérés contiennent environ 180 à 205 ml d' $\text{O}_2$  par litre d'air mais cette teneur peut être abaissée à 100 ml ou moins dans les sols inondés et dans des microenvironnements alentours des racines des plantes.

La teneur en  $\text{CO}_2$  est généralement comprise entre 3 et 30 ml par litre de sol et peut atteindre 100 ml par litre d'air en profondeur ou au voisinage des racines et en milieux saturés en eau. L'air du sol contient également d'autres substances, telles que  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  et, parfois, des composés organiques volatils (1).

## **1.3. Pollution des sols**

### **1.3.1. Définitions**

La pollution et la contamination sont deux expressions couramment employées pour désigner l'accumulation anormale et exogène, généralement due à une activité humaine, d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée (20).

Une substance toxique désigne une substance naturelle ou de synthèse, minérale ou organique, présentant une nocivité pour les organismes vivants, pouvant être absorbée par voie foliaire ou racinaire chez les plantes, par inhalation, ingestion ou contact chez les animaux, elle provoque une intoxication des organismes affectés en perturbant une fonction vitale pouvant entraîner la mort (21).

### **1.3.2. Formes de pollution**

On distingue deux types de pollution des sols (22)

- La pollution localisée : Elle se distingue par la présence ponctuelle dans les sols de substances dangereuses: déversements, fuites ou dépôt de déchets.
- La pollution diffuse : Elle implique des polluants à faible concentration sur de grandes surfaces, ils proviennent généralement d'épandages de produits: engrais ou pesticides, retombées atmosphériques.

Pour chacun de ces types, on distingue deux origines de pollution:

- La pollution accidentelle : Déversement ponctuel et momentané de substances polluantes.
- La pollution chronique : survenant sur de longues durées, telles que les fuites sur des conduites enterrées, les lixiviats issus de dépôts de déchets.

### **1.3.3. Micropolluants des sols**

#### **- Micropolluants inorganiques**

Il s'agit d'un ensemble d'éléments ou de composés dont l'accumulation est responsable d'une pollution du sol (20). Généralement ils sont non biodégradables, accumulatifs et toxiques quand ils sont présents en grande quantité (23).

Les micropolluants minéraux métalliques et non métalliques les plus rencontrés sont le cadmium, le chrome, le cuivre, le mercure, le nickel, le plomb, le sélénium, le zinc, l'arsenic, le molybdène, le cobalt, le bore et le thallium (24).

Les micropolluants minéraux sont présents naturellement à des concentrations généralement basses dans les sols. Ils proviennent en grande partie de l'altération de la roche mère du sous sol (22). Les activités anthropiques peuvent conduire à une augmentation de ces concentrations naturelles. L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement est liée à leur utilisation comme matières premières pour de nombreux produits industriels ou comme catalyseurs chimiques (16). On les trouve également dans des produits tels que les pesticides ou les engrais qui sont distribués sur une large surface. Ils sont aussi apportés sous forme de déchets urbains ou industriels, solides, liquides ou gazeux (25).

#### - **Micropolluants organiques**

Ce sont en grande majorité des produits de synthèse issus de l'activité anthropique (23). Ils proviennent principalement de trois ensembles d'activités industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques...), urbains (transport, traitement des déchets,...) et agricoles (utilisation de produits phytosanitaires) (26).

- **Polychlorobiphényles (PCB)**

Ce sont des substances chlorées très stables, largement utilisées dans la production des condensateurs, transformateurs, fluides hydrauliques, lubrifiants, pesticides (27), encres d'imprimeries et dans les peintures (28). Ils peuvent être dégradés à haute température (1200°C), leur combustion peut générer des dioxines et des furanes, substances cancérigènes et mutagènes. Les PCB sont insolubles dans l'eau (27) et ont une forte affinité pour les matières en suspension et les lipides. Ils s'accumulent donc dans le milieu naturel et se bioaccumulent fortement dans la chaîne alimentaire, par exemple dans les graisses des poissons et d'autres organismes vivants (23).

- **Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

Les HAP résultent de la combustion incomplète de la matière organique. Ils sont peu solubles dans l'eau et s'adsorbent fortement sur les particules organiques du sol, ce qui diminue considérablement leur biodisponibilité. Ils se bioaccumulent aussi dans les graisses, notamment chez les poissons et les mollusques (23).

- **Les composés organiques volatils (COV)**

Le terme de composés organiques volatils (COV) englobe un grand nombre de composés appartenant à différentes familles chimiques: alcanes, alcanes substitués, alcènes, alcools, composés aromatiques (benzène), esters, cétones. Les COV font l'objet de nombreuses utilisations en tant que solvants, dégraissants, dissolvants, conservateurs, agents de nettoyage.

Ils entrent donc, seuls ou en mélange, dans un grand nombre de procédés d'industries manufacturières utilisatrices de solvants, d'application et de fabrication de peinture, de préparation de caoutchouc, les imprimeries, les papeteries, la pharmacie, la parfumerie, les industries agro-alimentaires (29).

- **Phénols et dérivés**

Les phénols sont des composés aromatiques hydroxylés comprenant le phénol et ses dérivés tels que les chlorophénols (mono-, di-, tri-, tétra-, penta-), les nitrophénols, les crésols, les diméthylphénols (22). Ils peuvent être naturellement présents dans l'eau et le sol, en tant que produit de la décomposition des végétaux ainsi que des déchets végétaux et animaux (30). Les phénols sont utilisés dans l'industrie des matières plastiques, dans l'industrie pharmaceutique ainsi que dans la fabrication de nombreux produits : adhésifs, explosifs, coke, engrais, gaz d'éclairage, peintures, caoutchouc, articles renfermant de l'amiante, agents de préservation du bois et des textiles, médicaments, préparations pharmaceutiques, parfums. Ils servent aussi à la fabrication de détergents, de colorants, de pesticides (notamment les chlorophénols) (23). Les phénols proviennent également de la dégradation des insecticides organophosphorés et des herbicides chlorophénoxyacides (22).

Les chlorophénols sont des phénols chlorés renfermant un nombre variable de chlore dans leur molécule, depuis le monochlorophénol jusqu'au pentachlorophénol (PCP) (21).

Dans l'environnement, les chlorophénols proviennent de sources naturelles et anthropiques.

Les chlorophénols d'origine naturelle résultent de la chloration de la matière organique naturelle, de la dégradation des acides fluviqes chlorés naturels et de l'activité biologique dans certains types de sol par les champignons, les lichens et les insectes (8). Les sources anthropiques sont principalement d'origines industrielle, agricole et domestique (31). Les chlorophénols sont extensivement utilisés comme préservateurs des bois, insecticides, fongicides, herbicides (3). Ils peuvent aussi être générés comme sous produits dans la production industrielle et résulter de la combustion de déchets organiques (32).

- **Pesticides**

Couramment appelés produits phytosanitaires. Il s'agit généralement de produits de synthèse qui sont volontairement introduits par l'homme dans l'environnement soit pour protéger les récoltes et les denrées stockées, soit pour protéger les différents secteurs de l'agriculture intensive, soit encore pour lutter contre les vecteurs de maladies (33). Actuellement le nombre de ces composés est considérable, pour cela les producteurs et utilisateurs les classent en fonction de leur cible biologique (34):

- Les insecticides contre les insectes.
- Les herbicides contre les mauvaises herbes.
- Les fongicides contre les champignons.

Les herbicides représentent la classe économiquement et quantitativement la plus importante. De plus, les herbicides sont davantage persistants dans les sols que les insecticides et les fongicides et génèrent des produits de dégradation stables qui peuvent également présenter une activité biocide (22). Une fois dans l'environnement, les pesticides peuvent être transformés en un grand nombre de produits de dégradation, communément définis comme métabolites. Plusieurs études ont rapporté la présence de ces derniers dans les eaux souterraines. Le 2,4-D est l'un des herbicides les plus utilisés pour contrôler les mauvaises herbes. Une fois dans le sol, le 2,4-D est métabolisé en 2,4-dichlorophénol, métabolite récalcitrant, souvent détecté dans les eaux souterraines à un taux supérieur à 3,3 µg/L (35).

#### **1.4. Devenir des micropolluants organiques dans le sol**

La contamination du sol par les substances xénobiotiques est devenue un problème sérieux dans le monde, non seulement par la détérioration de la qualité du sol mais aussi par la contamination des ressources en eau par ruissellement ou par lixiviation (33).

La manifestation du caractère polluant de composés organiques est étroitement liée à leur devenir dans les sols (28).

Quand une substance est apportée au sol, elle est répartie entre les trois phases, solide, liquide et gazeuse. Cette répartition détermine la mobilité de la substance et, en conséquence, son transport dans l'air et les eaux, ainsi que sa biodisponibilité (1).

Outre la toxicité propre du polluant, qui dépend de sa concentration et de la nature de la cible considérée, sa rétention par le sol et sa persistance sont les deux facteurs fondamentaux conditionnant le caractère polluant et/ou sa manifestation.

La rétention englobe les processus d'adsorption d'une molécule organique sur le sol lui-même, sur les microorganismes du sol, ainsi que sur les plantes (36).

La persistance est définie par le temps de résidence d'un composé dans un compartiment défini. Elle est la résultante d'un ensemble de processus de dissipation, physico-chimique et biologique qui font diminuer la concentration du polluant en fonction de cinétiques caractéristiques du polluant et du milieu (37).

#### **1.4.1. Rétention des composés organiques xénobiotiques**

Plusieurs phénomènes physico-chimiques et biologiques sont impliqués dans la rétention des composés organiques.

##### **- Adsorption**

L'adsorption correspond à la rétention d'un composé à l'interface sol-eau ou sol-air. Elle est particulièrement 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 (1). L'adsorption/désorption est un processus dynamique au cours duquel les molécules sont continuellement en équilibre entre la phase solide et la phase liquide ou gazeuse (36). Le phénomène d'adsorption est directement lié aux caractéristiques de la molécule et à celles de l'adsorbant (sol). Différentes interactions ou liaisons peuvent s'établir entre une molécule organique et un support d'adsorption, il peut s'agir de forces de Van der Waals, de liaisons hydrogène, de liaisons ioniques, liaisons covalentes ou d'effet de protonation (38).

Les microorganismes, en particulier les champignons, sont capables de retenir des molécules organiques sous forme non extractible (1). On appelle résidus non extractibles, les résidus adsorbés de façon irréversible par les constituants du sol, ils ne peuvent en conséquence être extraits par les méthodes classiques d'extraction (solvants organiques, solutions aqueuses, extraction à chaud, agitation). Ces résidus comprennent aussi bien les molécules mères que leurs produits de dégradation (36).

##### **- Volatilisation**

Le terme de « volatilisation » comprend tous les processus physico-chimiques de transfert des composés du sol ou des plantes vers l'atmosphère. Elle est principalement régulée par la constante d'Henry qui se détermine par le rapport entre les concentrations en polluants dans la phase gazeuse et la phase aqueuse (39).

## **1.4.2. Dégradation**

La dégradation est un processus essentiel dans la dissipation d'un produit par sa transformation, elle influe sur la persistance et les possibilités de contamination. Ce processus peut entraîner une dégradation totale du produit ou simplement former des produits intermédiaires de dégradation (36). La contamination de l'environnement peut sélectivement enrichir des microorganismes spécifiques ou conduire à des échanges génétiques ou encore à l'induction d'enzymes spécifiques dans des sites pollués (40).

### **- Dégradation abiotique**

- **Hydrolyse**

L'hydrolyse d'un composé organique est un processus de transformation dans lequel une molécule d'eau ou un ion hydroxyle réagit pour former une nouvelle liaison carbone-oxygène (41).

- **Les réactions de réduction et d'oxydation**

Elles sont le plus souvent catalysées par des constituants inorganiques divers, tels que: un sol argileux, les semi conducteurs ou les cations (42).

- **Les réactions de dégradation photochimique**

La photolyse ou photodégradation est basée sur l'élimination de microorganismes et/ou la dégradation de molécules organiques par une radiation lumineuse qui peut être un rayonnement solaire et/ou ultraviolet (UV). Pour les polluants organiques, la destruction reste fonction de la molécule, de la radiation et de la durée d'exposition (34).

### **- Dégradation biologique**

La dégradation biologique est la conséquence de la présence de certains microorganismes (bactéries et champignons essentiellement) dans les sols (43). La biodégradation peut donc avoir lieu en présence (aérobie) ou en absence d'oxygène (anaérobie). En présence d'oxygène, deux types de biodégradation de composés organiques peuvent avoir lieu : minéralisation ou biotransformation.

La biotransformation est une biodégradation incomplète qui peut transformer un composé en métabolites organiques stables. Ces derniers peuvent être inoffensifs ou parfois plus toxiques que le polluant initial (44).

La minéralisation est une biodégradation oxydative complète des molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) (17).

La biodégradation est basée sur deux processus: Croissance et co-métabolisme microbiens.

Dans le cas de la croissance, les polluants organiques sont utilisés comme sources de carbone et d'énergie. Ce processus conduit à une dégradation complète (minéralisation).

Le co-métabolisme est défini comme un métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance qui est utilisé comme source primaire de carbone et d'énergie.

Les réactions enzymatiques principales de la biodégradation aérobie sont des oxydations catalysées par des oxygénases et des peroxydases. Cependant, en présence d'une molécule d'oxygène, certains composés (benzoates, phénols, hydrocarbonés aromatiques) sont initialement oxydés par une mono ou une dioxygénase et convertis en catéchols ou protocatechuates, par la suite minéralisés (45).

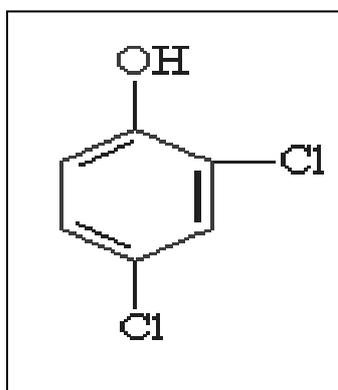
La biodégradation dépend de l'activité microbienne et de la biodisponibilité des polluants. La biodisponibilité se définit comme la propriété d'un élément ou d'une substance d'atteindre les membranes cellulaires des organismes vivants (23). Ce paramètre joue un rôle très important dans la nocivité réelle d'un élément. Un changement de la biodisponibilité équivaut à un changement de la toxicité. C'est le statut physique (adsorbé, solubilisé) ou chimique (complexe, ionisé) dans lequel se trouve un polluant et qui conditionne son écotoxicité.

La bioaccumulation est un phénomène par lequel une substance présente dans un biotope pénètre dans l'organisme, même si elle n'a aucun rôle métabolique et même si elle lui est toxique (21). Elle correspond à l'augmentation de sa concentration dans un organisme vivant par rapport à sa concentration dans le milieu environnant, en intégrant les apports *via* l'eau, les sédiments, l'air, le sol et la nourriture. La bioaccumulation est estimée par le facteur de bioconcentration (BCF) qui est le rapport de la concentration dans l'organisme vivant sur la concentration dans le milieu (46).

Tous les organismes vivants sont ainsi capables, à divers degrés, d'accumuler des substances toxiques. Ce qui peut dans certains cas entraîner des phénomènes de transfert et d'amplification dans la chaîne alimentaire, avec des teneurs observées d'autant plus fortes que l'organisme est élevé dans la chaîne alimentaire (23).

**Tableau 2. Propriétés physico-chimiques du 2,4-dichlorophénol**

Paramètre	Valeur	Références
Masse molaire g/mole	163	(51, 52)
Point d'ébullition (°C)	210	(41, 51, 53)
Point de fusion (°C)	45	(54)
Densité (50°C)	1,388	(54)
Pression de vapeur (Pa)	8,6 à 20°C 16 à 25°C 133,000 à 53°C	(51) (51) (41, 54)
Solubilité dans l'eau 20-25°C (g/L) Solubilité dans les solvants organiques	4,5 Tétrachlorure de carbone, éthanol, benzène, éthyle d'éther. Chloroforme.	(51, 54, 55) (31)
Constante de Henry (Pa. m <sup>3</sup> /mole) à 20-25°C	4. 10 <sup>-1</sup>	(51, 55)
Log K <sub>ow</sub>	3,2	(46)

**Figure 1.** Structure chimique de 2,4-dichlorophénol (10)

## **2. Le 2,4-dichlorophénol**

### **2.1. Généralités**

#### **2.1.1. Structure et propriétés chimiques du 2,4-dichlorophénol**

La formule brute du 2,4-dichlorophénol est  $C_6H_4Cl_2O$ . Le 2,4-dichlorophénol est nommé aussi 2,4-dichlorohydroxybenzène (47). La structure du 2,4-dichlorophénol est représentée dans la figure 1.

#### **2.1.2. Propriétés physiques**

A température ambiante, le 2,4-dichlorophénol est un solide incolore, blanc ou jaune pâle, en forme de cristaux ou d'aiguilles (32, 41). Il a une forte odeur phénolique qui sert comme un bon indicateur de sa présence (48). L'odeur du 2,4-dichlorophénol peut être sentie à des taux de 0,35  $\mu\text{g/L}$  dans l'eau (49) et de 1,4  $\text{mg/m}^3$  dans l'air (50). Ses propriétés physico-chimiques sont mentionnées dans le tableau 2.

### **2.2. Principe de production**

Industriellement, le 2,4-DCP est obtenu par chloration du phénol ou du monochlorophénols (*p*-chlorophénol, *o*-chlorophenol) ou encore par un mélange de ces composés à haute température et dans un réacteur en fonte de fer (32,56). Dans le processus de production du 2,4-dichlorophénol, plusieurs impuretés peuvent se former: 2,6-dichlorophénol (environ 8%), peroxy phénols chlorés, diphenyl-esters chlorés, chlorodibenzofuranes (32).

### **2.3. Utilisation**

Le 2,4 DCP est un précurseur chimique qui contribue principalement à la production de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique (2,4-D) (26) et de ses dérivés, à l'exemple de l'acide 2-(2,4-dichlorophenoxy) propionique (2,4-DP) (56), utilisés comme germicides et stérilisant des sols (55). Il est aussi utilisé dans la production des pentachlorophénol (PCP) et des chlorophénols méthylés qui sont utilisés comme antimites, antiseptiques et désinfectants (11).

### **2.4. Toxicité**

Le 2,4-dichlorophénol pénètre dans le corps humain par inhalation de ses aérosols, à travers la peau et par ingestion (56).

Par voie orale, le 2,4-dichlorophénol est très rapidement absorbé par le tractus gastro-intestinal, du fait de sa forte solubilité lipidique et sa faible ionisation au pH physiologique. Il s'accumule principalement au niveau du foie et des reins. 80 à 90 % sont éliminés sous forme de glucuronates ou de sulfates par les urines. Il a par ailleurs été montré que le caractère lipophile du 2,4-dichlorophénol lui permet de se lier de manière réversible à l'albumine sérique humaine (32).

#### **2.4.1. Toxicité aigue**

Les symptômes les plus fréquents consécutifs à l'exposition aigue, accidentelle ou volontaire, au 2,4-dichlorophénol sont des convulsions, une ataxie, des maux de tête et une diminution de la température corporelle (32). Par inhalation, la sensation de brûlure s'accompagne d'une toux avec irritation de la gorge. Des crampes abdominales sont aussi fréquemment ressenties lors de l'ingestion de 2,4-dichlorophénol (57).

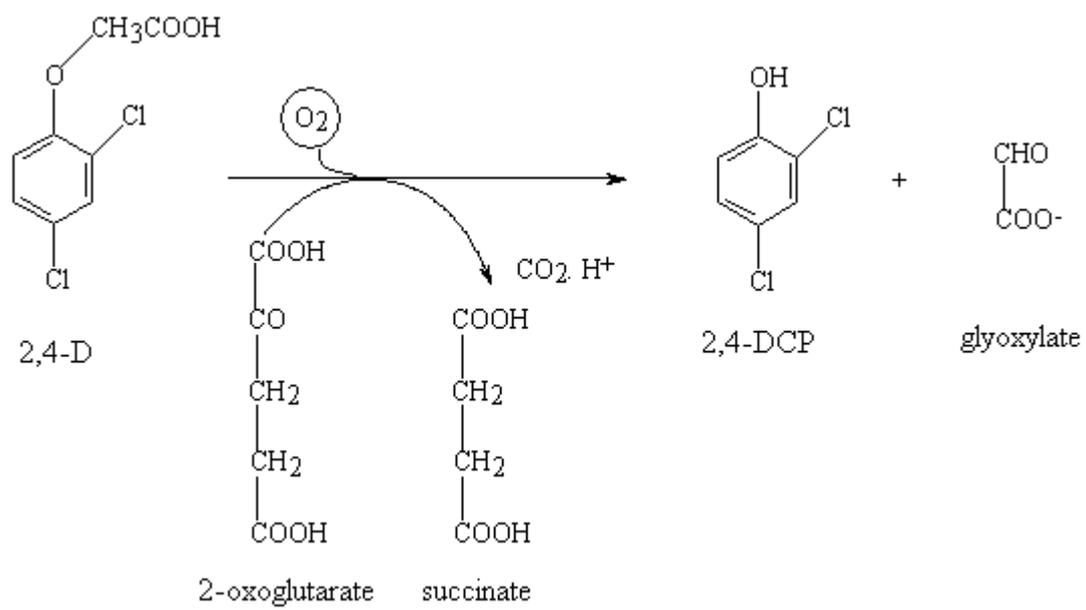
#### **2.4.2. Toxicité chronique**

En milieu professionnel, quelques cas de chloracné et de porphyrie résultent d'une exposition dermique au 2,4-dichlorophénol avec une augmentation de l'excrétion de coproporphyrines. Dans une autre étude, réalisée sur des travailleurs exposés non exclusivement au 2,4-dichlorophénol, une augmentation significative de l'incidence de cancers du poumon, cancers du rectum et sarcomes des tissus conjonctifs a été observée chez les hommes. Chez les femmes, les tumeurs se situent au niveau ORL (32).

### **2.5. Caractérisation de la pénétration de 2,4-dichlorophénol dans l'environnement**

Le 2,4-dichlorophénol est naturellement présent dans l'environnement, c'est une substance à activité hormonale (58) ou antibactérienne (59), naturellement produite par certains microorganismes dont *Penicillium* sp. (19).

Les chlorophénols, y compris le 2,4-dichlorophénol, entrent dans l'environnement à travers un usage direct (60), renversement accidentel et/ou comme produits de dégradation d'autres composés. Cependant, ils sont communément détectés dans le sol, les sédiments, les eaux de surfaces et les eaux usées (61).



**Figure 2.** Formation de 2,4-DCP à partir de 2,4-D (67)

### **2.5.1. Air**

La volatilisation de 2,4-DCP constitue son mécanisme majeur de dispersion dans l'atmosphère. Cependant, une petite fraction (environ 5%) de 2,4-DCP est émise sous forme de vapeur dans l'atmosphère à partir du sol (5, 10, 54,62) et l'eau (1). Le 2,4-DCP se forme aussi lors de la combustion de la matière organique, il est présent dans les gaz émis lors de l'incinération des déchets municipaux, du charbon, des bois et des herbicides à base de 2,4-DCP (63).

### **2.5.2. Eau**

Les décharges industrielles constituent la source principale de pollution des eaux par les monochlorophénols et les dichlorophénols (64). Le 2,4-DCP est présent dans les effluents des industries de production du fer, des composés électriques, des équipements photographiques (57), cokerie, de la distillation du bois, des industries pharmaceutiques et textiles, de tanneries, des raffineries pétrolières (65) et par la production de 2,4-D. Le 2,4-DCP est aussi généré comme sous produit pendant la désinfection des eaux par chloration (5).

### **2.5.3. Sol**

Après utilisation des herbicides dans des sites agricoles, le 2,4-DCP est le produit majeur de transformation du 2,4-D par photolyse solaire et/ou par les activités microbiennes dans les sols (66). Le 2,4-DCP se forme par oxydation de la chaîne latérale de l'herbicide 2,4-D (Figure 2). Il peut aussi être présent comme impureté dans la formulation de certains herbicides (68), particulièrement le 2,4-D, 2,4,5-T et le lindane (69). Le 2,4-DCP s'accumule dans le sol par l'apport des eaux usées polluées qui les contaminent (5). Il est aussi présent dans les lixiviats, riches en composés organiques chlorés, issus de l'enfouissement des déchets municipaux solides (70). En général, la concentration des chlorophénols dans les sols contaminés s'échelonnent entre 0,1 et 10 mg / kg (71).

## **2.6. Devenir de 2,4-dichlorophénol dans l'environnement**

Le devenir des chlorophénols dans l'environnement et leur transport sont contrôlés par leurs propriétés chimiques et physiques et par les conditions environnementales (31).

### **2.6.1. Dynamique**

#### **- Dans l'air**

Compte tenu de sa pression de vapeur, le 2,4-dichlorophénol émis dans l'atmosphère n'est présent que sous forme de vapeur. En cas de précipitations, le 2,4-dichlorophénol peut être entraîné par la pluie et s'introduire dans les compartiments terrestres (sols, eau et sédiments) (32).

#### **- Dans l'eau**

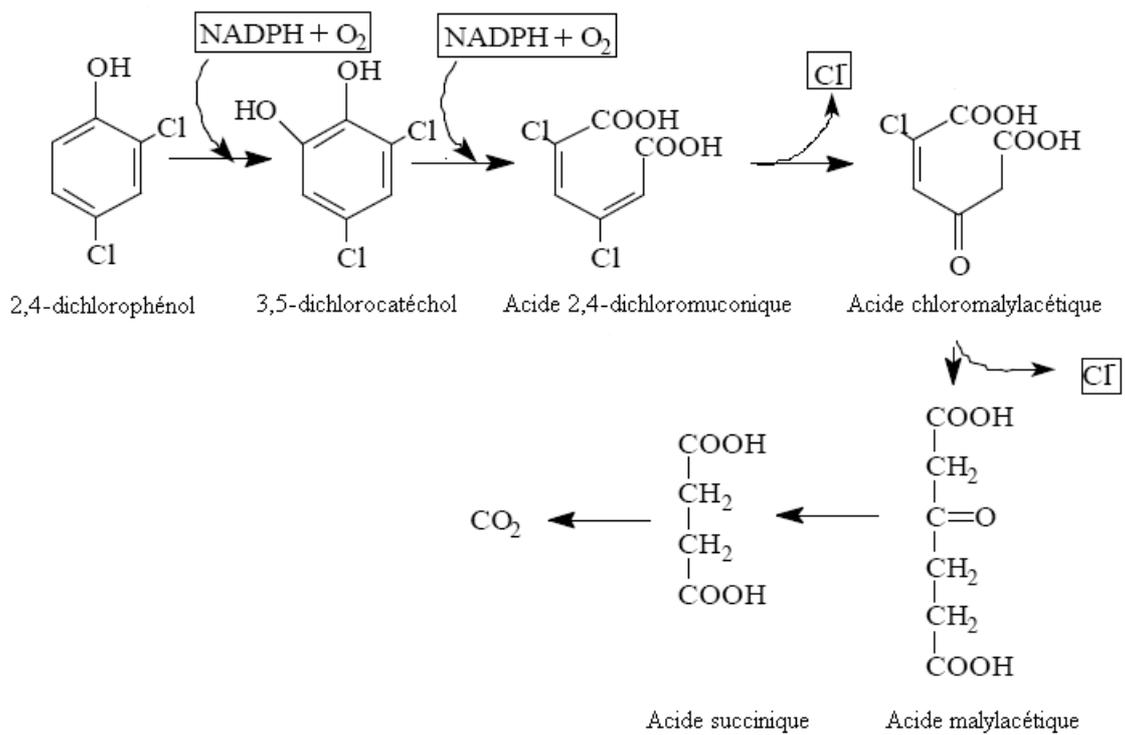
Dans les milieux aquatiques, les chlorophénols existent sous forme dissociée et non dissociée. Ces formes dépendent du pH du milieu et des propriétés physiques et chimiques des molécules (61). Lorsqu'il atteint les eaux de surface, le 2,4-dichlorophénol a une forte tendance à s'adsorber sur les particules en suspension (32). La phase demeurant libre dans l'eau se volatilise dans l'atmosphère. La volatilisation de 2,4-DCP à partir d'eau est faible, donc elle ne constitue pas un processus majeur dans sa disparition des eaux de surfaces (31).

#### **- Dans le sol**

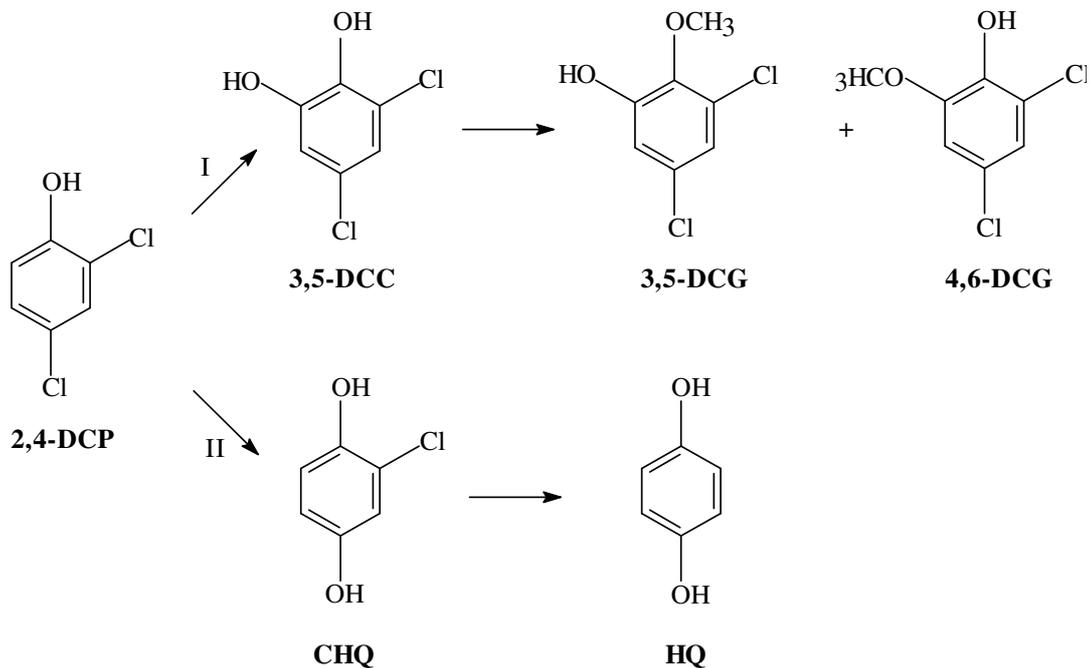
Lorsqu'il est présent dans le sol, le 2,4-dichlorophénol a une mobilité faible ou modérée. Compte tenu de sa constante de Henry, la volatilisation du 2,4-dichlorophénol à partir de sols humides constitue un processus de transfert important. Pour les mêmes raisons, la volatilisation à partir d'un sol sec est relativement faible (32). L'adsorption sur les particules de sol est gouvernée par le pourcentage d'ions oxydes et par le pH (l'adsorption diminue lorsque le pH augmente) (15).

Dans les sols alcalins, le 2,4-dichlorophénol est présent sous forme principalement ionisée donc dissociée, ce qui réduit son adsorption sur le matériel particulaire. A l'inverse, dans des sols acides, l'adsorption sera plus élevée, ce qui limite sa mobilité et affecte sa biodisponibilité (52). Compte tenu du pKa de 7,8 à 20 °C, le 2,4-dichlorophénol est sous forme ionisée à pH 10 et sous forme non ionisée à pH <7. La forme ionisée ne s'adsorbe pas sur les sols organiques neutres ou chargés négativement. Il en est de même pour la forme non-ionisée (32).

L'adsorption de 2,4-DCP augmente aussi avec l'augmentation en matière organique dans le sol (41). En général, un composé chimique va se partager dans la matière organique si le log  $K_{ow}$  est inférieur à 1, log  $K_{ow}$  du 2,4-dichlorophénol est supérieur à 2, ce qui indique son partage dans les sédiments (72).



**Figure 3.** Voie proposée de la minéralisation du 2,4-dichlorophénol (75)



**Figure 4.** Voie proposée de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol par *Mortierella* sp. (62)

## 2.7. Rémanence dans le milieu

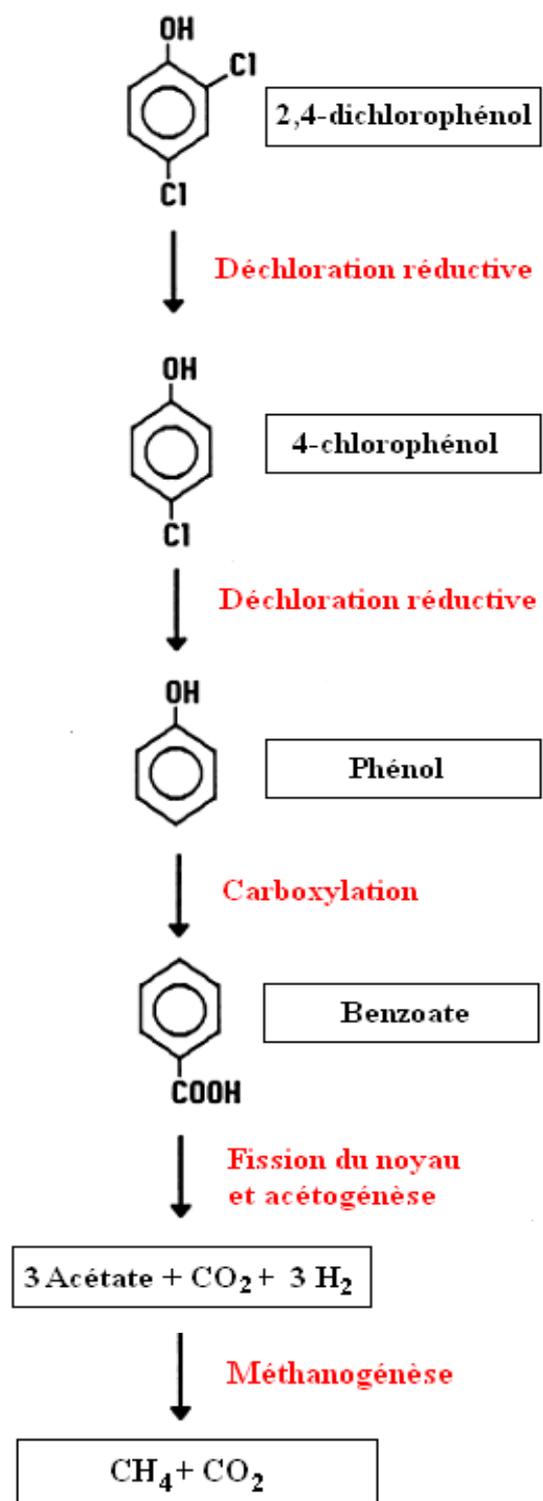
### 2.7.1. Dégradation abiotique

La dégradation abiotique dans l'atmosphère est gouvernée par la constante de réaction photochimique. Ce taux est évalué à  $1,06 \cdot 10^{-12}$  cm<sup>3</sup>/molécule à 25 °C, qui correspond à une demi-vie de 15 jours et à la formation de  $5 \cdot 10^5$  radicaux hydroxyle par cm<sup>3</sup>. En raison de l'absence de groupes fonctionnels hydrolysables, le 2,4-dichlorophénol est faiblement hydrolysé dans l'eau (32). Le 2,4-dichlorophénol peut aussi disparaître par photo-décomposition (73).

### 2.7.2. Dégradation biotique

#### - Dégradation aérobie

La dégradation aérobie des chlorophénols par les microorganismes correspond à la participation d'enzymes, les oxygénases, pour incorporer l'oxygène atmosphérique à leurs substrats. Pour la fission du noyau de benzène, l'anneau est préalablement dihydroxylé par une oxygénase. La fission de l'anneau se produit par une seconde réaction catalysée par une oxygénase et comportant l'insertion du dioxygène dans le noyau aromatique. L'étape cruciale dans la biodégradation des chlorophénols est l'élimination du chlore. Pour le catabolisme du dichlorophénol la di-oxygénase des microorganismes ouvre habituellement l'anneau aromatique dihydroxylé avant sa déchloration (74) (figure 3). Les chlorocathécols sont les intermédiaires qui se forment au cours de la dégradation aérobie des mono et dichlorophénols (28). La biodégradation du 2,4-dichlorophénol par une *meta*-fission du noyau génère le 3-chlorocatéchol, indicatif de la présence d'une catéchol 2,3-dioxygénase (76). Le 3-chlorocatéchol est un substrat furtif qui se produit via la *meta*-fission du 2,4-DCP par l'enzyme *meta*-pyrocatechase. Ce dernier génère un halogénure d'acyle qui réagit avec l'enzyme en provoquant une inactivation suicide (77). Certains microorganismes utilisent deux voies pour dégrader le 2,4-dichlorophénol. Dans la première voie (figure 4-I), une *ortho*-oxydation du 2,4-DCP donne le 3,5-dichlorocathéchol (3,4-DCC). Selon la position de la méthylation des groupements hydroxyles, le 3,4-DCC se convertit en deux types de dichloroguaiacols: 3,5-dichloroguaiacol (3,5-DCG) et 4,6-dichloroguaiacol (4,6-DCG). La deuxième voie de la biodégradation s'effectue par une déchloration oxydative (élimination de deux ions de chlorure) en formant ainsi le chlorohydroquinone (CHQ) et le hydroquinone (HQ) (figure 4-II) (62).



**Figure 5.** Schéma de biodégradation anaérobie du 2,4-dichlorophénol (78)

Différents types de bactéries et de champignons, *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Panus* sp., *Coriolus* sp., *Chrysosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Mucor* sp., sont connus pour leur capacité à dégrader les phénols et leurs dérivés, y compris le 2,4-dichlorophénol (10,11).

Les chlorophénols, en fortes concentrations, inhibent toujours la croissance cellulaire en agissant négativement sur le système des oxygénases. Cependant, cet effet toxique peut être allégé dans une certaine mesure par une adaptation des microorganismes aux chlorophénols ou par une addition de substrats de croissance conventionnels dans le milieu (11).

### **- Dégradation anaérobie**

Sous des conditions anoxiques, la dégradation des chlorophénols est initialisée par une étape de déchloration réductive où le noyau est totalement déchloré, un clivage du noyau peut avoir lieu. Une dégradation avancée engendre la production de méthane et de dioxyde de carbone (53,78). Le produit majeur de la dégradation anaérobie du 2,4-dichlorophénol est le 4-chlorophénol (22) (figure 5).

## **2.8. Bioaccumulation du 2,4-dichlorophénol dans les organismes vivants**

### **2.8.1. Plantes**

Le 2,4-dichlorophénol peut être absorbé par les plantes à des concentrations proportionnelles à leur stade de maturité. Une concentration de 0,001µg par gramme est mesurée dans les grains de soja et 0,003 µg par gramme dans les grains d'avoine (79).

### **2.8.2. Organismes aquatiques**

La bioaccumulation du 2,4-dichlorophénol chez les organismes aquatiques est relativement faible (64). Des BCFs de 7,1 à 69 ont été calculés pour la carpe, 257 à 263 pour les algues planctoniques d'eau douce et de 10 pour la truite (32). Le 2,4-dichlorophénol s'accumule principalement dans la bile des poissons, une concentration de 240 à 7700 ng de 2,4-DCP est détectée dans un gramme de la bile de perche (80). L'accumulation du 2,4-dichlorophénol dans le tissu musculaire des poissons demeure cependant relativement faible. La bioaccumulation des chlorophénols à travers la chaîne trophique est relativement insignifiante (<10%), comparativement aux résidus résultant de la bioconcentration (transfert direct dans l'organisme à partir de l'eau) (32).

# Matériel et méthodes

## **1. Milieu de culture:**

Le 2,4-dichlorophénol étudié est un agent de grade analytique (97%, Reidel de Haen). Le milieu de culture utilisé est un milieu salin minimum où le 2,4-dichlorophénol est la seule source de carbone et d'énergie à une concentration de 200mg/L. Il est composé par les éléments minéraux suivants:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (112 mg),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 mg),  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2,5 mg),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (340 mg),  $\text{NaHPO}_4$  (355 mg),  $\text{CaCl}_2$  (14 mg),  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,22 mg),  $\text{KNO}_3$  (50 mg) pH 6,8 (81) (modifié). L'ammonium est remplacé par le nitrate comme source d'azote pour éviter une croissance microbienne suite à une nitrification (60).

## **2. Inoculum**

### **2.1. Prélèvement de sol**

L'échantillon de sol est prélevé à une profondeur de 10 cm d'un site agricole de la région de HAMPLA (BATNA), il est mis dans un sachet stérile est conservé à 4°C pour réduire l'activité de populations microbiennes (82).

### **2.2. Préparation de la suspension de sol**

- **10 g de sol sont déposés dans 95 ml d'une solution saline stérile (0,85% de NaCl).**
- **Le mélange liquide-solide est agité pendant 20 minutes à 200 tours par minute (83).**

### **2.3. Préparation des dilutions décimales**

**L'inoculum est dilué jusqu'à la dilution  $10^{-9}$ . L'eau physiologique stérile est utilisée comme diluant.**

## **3. Cinétique de la biodégradation**

### **3.1. Conditions de culture**

Dans des conditions d'asepsie de microbiologie, des aliquotes de 0,8 ml de la suspension de sol et ses diverses dilutions ( $10^{-1}$ - $10^{-9}$ ) sont utilisés pour ensemercer 18 ml du milieu minimum (4% d'inoculum). Cette culture est effectuée dans des fermenteurs miniaturisés. Ce système de culture permet en outre de mesurer qualitativement et quantitativement les gaz fermentaires éventuellement produits.

Deux témoins sont préparés dans les mêmes conditions expérimentales. Un témoin sans substrat où le milieu minimum est inoculé par le microbiote de sol en l'absence du 2,4-dichlorophénol et un témoin stérile sans inoculum pour suivre une éventuelle dégradation abiotique du 2,4-dichlorophénol. Tous les fermenteurs sont standardisés aux mêmes volumes d'air et de milieu minimum.

Les fermenteurs sont incubés à 30°C en mode statique et en cultures discontinues pendant 56 jours. Le suivi de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol est effectué par un dosage de sa concentration. Le pH du milieu et sa teneur en chlore sont mesurés à différents intervalles de temps: 2h, 6h, 8h, 18h, 24h, 48h, 72h, 7 jours, 14 jours, 30 jours et 56 jours. Trois fermenteurs sont utilisés pour chaque intervalle de temps.

### **3.2. Méthode de dosage du 2,4-dichlorophénol (9, 84)**

Après avoir séparé la biomasse de la culture par centrifugation à 5000 tours par minute pendant 10 minutes, les surnagants sont récupérés pour mesurer la concentration du 2,4-dichlorophénol au spectrophotomètre par la méthode colorimétrique de 4-aminoantipyrine. Les échantillons sont traités en plaçant 10 ml dans des tubes à essai, additionnés de 0,25 ml de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (0,5N). Le pH est ajusté à  $7,9 \pm 0,1$  avec 200  $\mu\text{l}$  du tampon  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=6,8). Une quantité de 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de 4-aminoantipyrine (2%) est ajoutée et les tubes sont bien agités. Enfin, 100  $\mu\text{l}$  de ferrocyanure de potassium (8%) est additionnée avec agitation et le mélange est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. L'absorbance est lue à 510 nm (annexe1) et les concentrations sont calculées à partir de la courbe d'étalonnage préétablie (annexe2).

### **3.3. Dosage de l'ion chlorure**

Lors de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol, une déchloration de la molécule peut avoir lieu, libérant ainsi des ions chlorure ( $\text{Cl}^-$ ). Pour mesurer la concentration de l'ion chlorure éventuellement libéré, 1 ml de  $\text{HNO}_3$  (2 moles/litre) et 0,5 ml d'une solution du nitrate d'argent sont ajoutés aux 10 ml des échantillons. Après agitation et incubation des échantillons pendant 5-10 minutes dans l'obscurité, la densité optique est mesurée à 365 nm (85).

## 4. Isolement et purification des souches microbiennes responsables de la biodégradation

Après 7, 14, 30 et 56 jours, un étalement sur gélose nutritive est effectué à partir des dilutions :  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  (méthode de la dilution-extinction) (18) pour isoler les groupements microbiens dominants. Les souches ensemencées sont incubées à 30°C. Sur la base de l'aspect macroscopique, différentes colonies sont prélevées et repiquées sur le même milieu, jusqu'à leur purification.

### 4.1. Confirmation de la capacité des souches à dégrader le 2,4-dichlorophénol

Les groupements microbiens isolés sont testés pour leur capacité à dégrader le 2,4-dichlorophénol. Chaque souche pure est étalée sur un milieu minimum solide contenant 200 mg/l de 2,4-dichlorophénol (83).

### 4.2. Identification

Les souches microbiennes isolées sont identifiées par les méthodes classiques, par la détermination de leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques.

#### 4.2.1. Souche fongique

L'identification des moisissures fait essentiellement appel à leur morphologie. Elle comprend l'étude microscopique du mycélium (absence ou présence de cloison, méthodes de ramification, différenciation des thallospores), nature des organes différenciés (forme, couleur, texture des parois, ornementation) (86).

#### 4.2.2. Souche bactérienne

##### a. Observation microscopique

- **A l'état frais:** une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des microorganismes et d'en déceler la forme.
- **Coloration de Gram:** les souches isolées sont fixées et colorées selon la méthode de Gram. Cette coloration permet de différencier les bactéries en deux groupes, en fonction de la couleur obtenue: les Gram positifs et les Gram négatifs.

## **b. Caractères biochimiques et physiologiques**

### **- Type respiratoire**

Chaque souche pure est ensemencée sur la gélose semi solide Viande-foie (VF) et incubée à 30°C. Ce milieu présente un gradient de concentration en O<sub>2</sub>, plus abondant en surface. Le type respiratoire est exprimé par la localisation du niveau de la croissance bactérienne dans le tube:

- Colonies dans tout le tube: Bactéries aérobies-anaérobies facultatives.
- Colonies en haut du tube: Bactéries aérobies strictes.
- Colonies en haut du tube légèrement sous la surface: bactéries micro-aérophiles
- Colonies en bas du tube: bactéries anaérobies strictes.

### **- Recherche de la cytochrome-oxydase**

Généralement des disques imprégnés du réactif chlorhydrate sont utilisés (disques oxydases). Un disque d'oxydase est placé sur une lame, une colonie de la souche étudiée est déposée sur ce dernier. L'apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes montre que la bactérie est oxydase-positive et qu'elle possède la cytochrome oxydase. Et s'il n'y a rien qui apparaît, la bactérie est dite oxydase-négative et elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase) (87).

### **- Hydrolyse de la cellulose**

Les souches sont cultivées sur le milieu solide Extrait de levure-Cellulose, contenant 7% (P/V) d'extrait de levure et 3% (P/V) de cellulose (Type101). Après incubation à 30°C, les cultures sont recouvertes par la solution de rouge Congo (0,1%) pendant 15 min, puis rincées par la solution de chlorure de sodium (NaCl, 1M) pendant 15 min. Enfin, les cultures sont recouvertes par la solution d'acide chlorhydrique (HCl, 1M). L'activité cellulolytique est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (88).

### **- Recherche de la nitrate réductase**

Des tubes contenant un bouillon nitraté sont ensemencés par les souches isolées, puis incubés à 30°C. Après incubation, quelques gouttes des réactifs I et II sont ajoutées aux cultures. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge dans le milieu.

## - Production d'indole

Les souches isolées sont ensemencées dans des tubes contenant l'eau peptonée exempt d'indole. Après incubation, quelques gouttes du réactif de KOVACS sont ajoutées aux cultures. L'apparition d'un anneau rouge indique la production d'indole.

## - Mise en évidence de la production de pigments spécifiques

Les souches élaborant des pigments diffusibles sur la gélose nutritive sont ensemencées sur les milieux de KING (milieu KING A et milieu KING B). Ces milieux permettent de différencier les espèces du genre *Pseudomonas*. La production de pigments est influencée par la composition du milieu, ce qui justifie l'utilisation de deux milieux différents :

- La production de pyocyanine, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions inorganiques. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A indiquée par une coloration diffuse bleue.
- La production de pyoverdine, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B, elle est révélée par l'apparition d'une coloration fluorescente jaune-vert (87).

## 6. Analyse statistique

Les résultats de la cinétique de biodégradation du 2,4-dichlorophéol ont été soumis à une analyse d'ANOVA pour vérifier l'effet dilution par l'utilisation du logiciel informatique MINITAB/version 13.31 (2000) suivant le modèle :

$$Y_{ij} = \mu_{ij} + \alpha_i + \varepsilon$$

Où :

$Y_{ij}$  : observation générale de la biodégradation du 2,4-dichlorophéol.

$\mu_{ij}$  : moyenne générale.

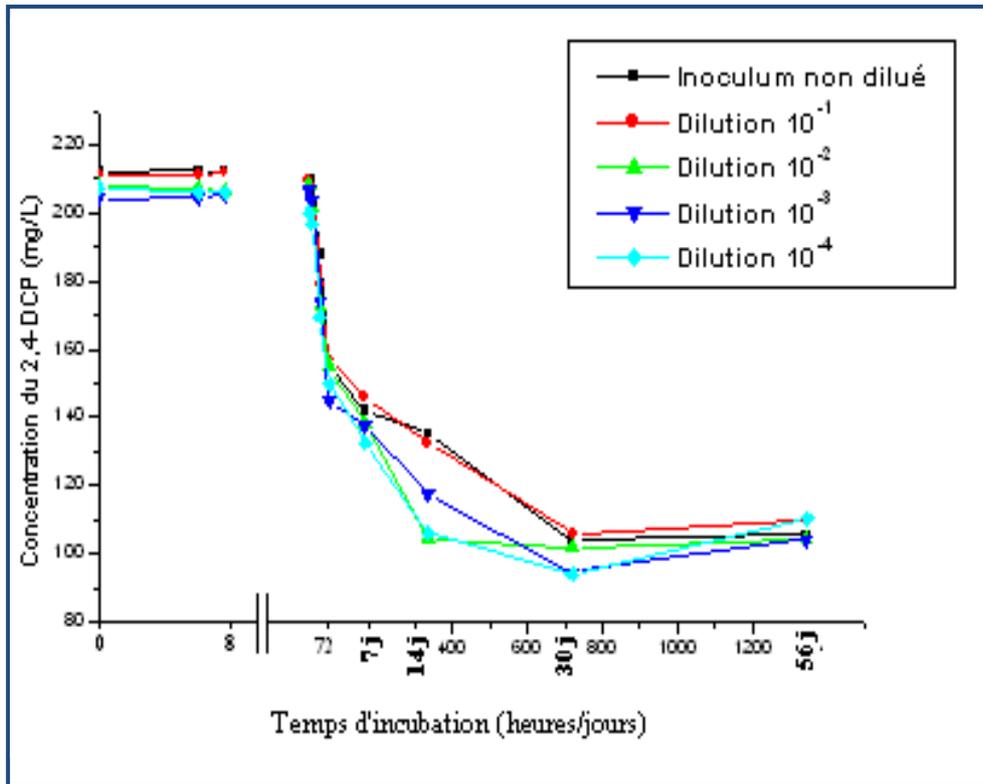
$\alpha_i$  : effet dilution

$\varepsilon$  : erreur standard.

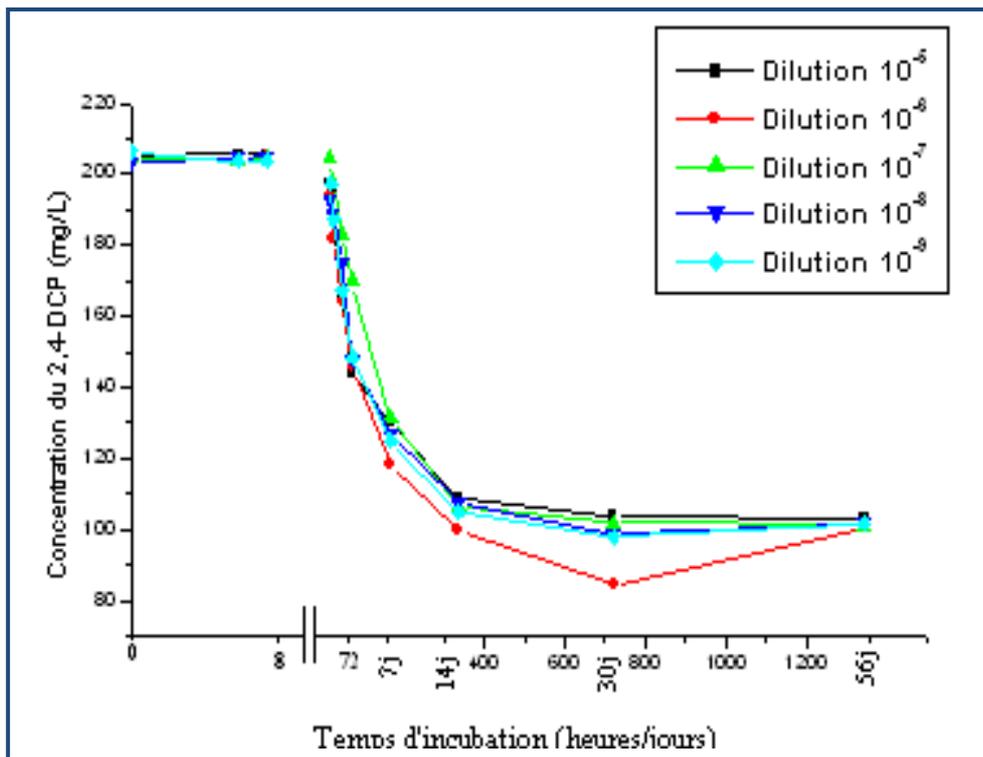
La comparaison entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est effectuée par le test de Student.

# Résultats et discussion

A



B



A : Inoculum non dilué-Dilution  $10^{-4}$

B : Dilution  $10^{-5}$ -Dilution  $10^{-9}$

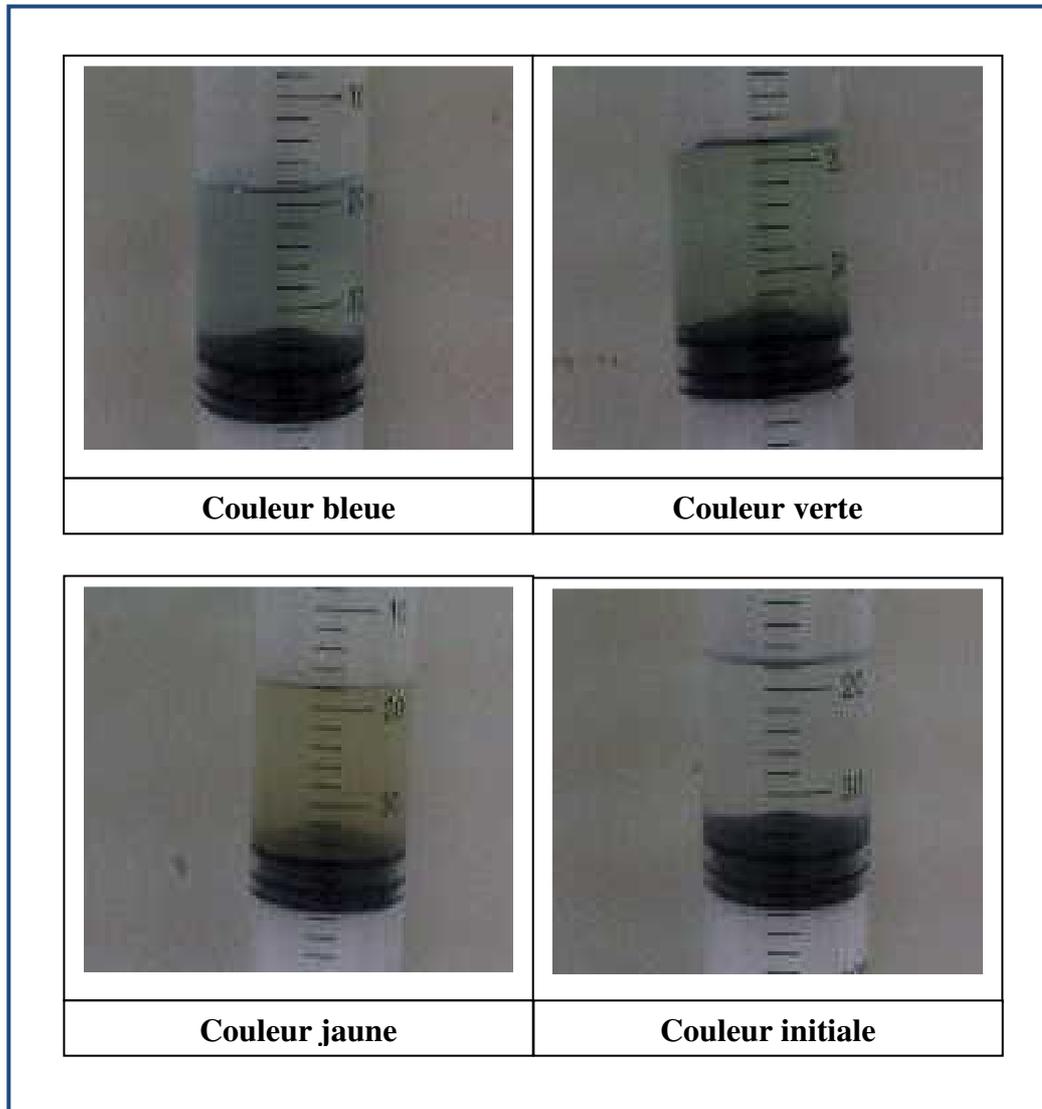
Figure 6. Cinétique de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol

## 1. Qualité de l'échantillon de sol

Notre échantillon de sol est soumis à une analyse quantitative préalable des phénols. Il ressort de cette analyse que la concentration initiale des phénols est de 2,183 mg par gramme de sol. La technique spectrale ne permet pas de séparer les différents types de phénols, mais seulement de mesurer la concentration du mélange car la plupart des phénols absorbent à la même longueur d'onde que celle du 2,4-DCP (510 nm). Ces phénols peuvent être des produits de la dégradation d'autres composés, majoritairement les pesticides, surtout que le sol est agricole et qu'il a subi des traitements réguliers aux pesticides pendant des années, ce qui explique la présence de phénols dans l'échantillon brut.

## 2. Cinétique de biodégradation du 2,4-DCP

La figure 6 montre les cinétiques de biodégradation du 2,4-DCP par l'inoculum non dilué et ses diverses dilutions, jusqu'à la dilution  $10^{-9}$ . Elles montrent que les microorganismes impliqués dans le processus se situent parmi les populations dominantes et expriment toutes une phase de latence de 8 heures. Cette phase correspond à une période d'adaptation du microbiote au 2,4-DCP. Ceci indique que les enzymes ou le système enzymatique impliqués dans la dégradation du 2,4-DCP ne sont pas produits de façon constitutive, cette étape est donc nécessaire pour l'acclimatation du microbiote au substrat, ce qui est une situation commune (10). Selon plusieurs auteurs, des concentrations élevées du 2,4-DCP sont connues pour prolonger la phase de latence (74, 89). Certains auteurs constatent une phase de latence de 27 heures pour des cultures à 100 mg/L de 2,4-DCP (6). Dans notre étude, la phase de latence n'est pas aussi longue (8 heures), malgré l'utilisation d'une concentration initiale élevée de 2,4-DCP (200 mg/L). Ceci laisse supposer que le microbiote tellurique est constitué d'une population microbienne active, ou que les microorganismes du sol s'adaptent rapidement en présence de ce composé (10). Cette adaptation rapide est une conséquence logique à une biosynthèse enzymatique accélérée par la culture mixte. Cette situation pourrait bien résulter d'interrelations synergiques entre les espèces microbiennes co-cultivées (90). En plus, l'adaptation rapide du microbiote tellurique semble également liée à l'origine de l'inoculum qui provient d'un sol agricole particulièrement exposé à la présence du 2,4-D et par conséquent en contact latent avec le 2,4-DCP, produit majeur de sa dégradation à la fois photolytique et biologique (66).



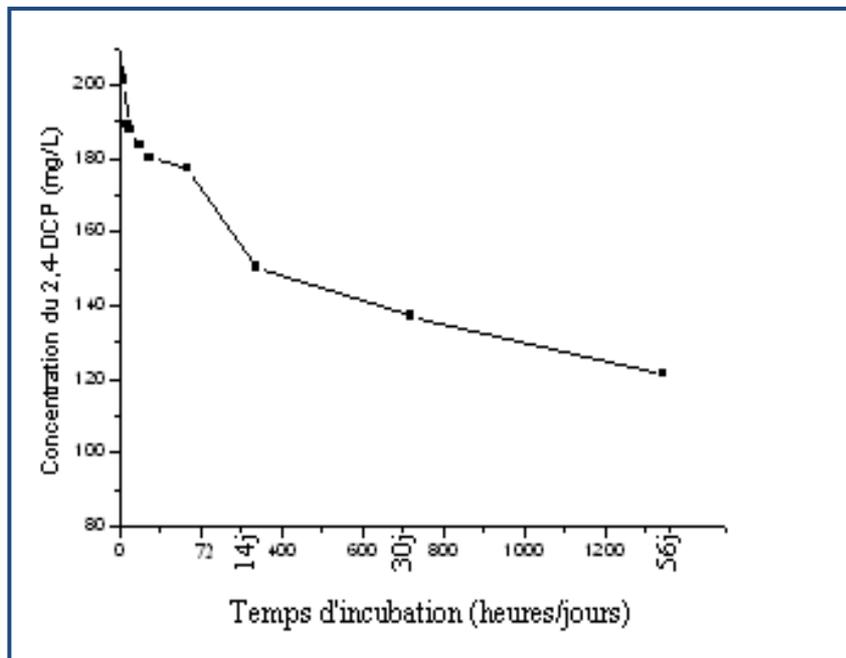
**Figure 7. Changement de couleur du milieu de culture**

C'est probablement pour cette raison que le microbiote tellurique étudié s'adapte rapidement à ce composé, bien plus vite que ne le montrent les études analogues (6,10,74, 89). Une telle situation pourrait être liée à des échanges génétiques ou à l'induction du système enzymatique des microorganismes provenant de sites contaminés (39), elle pourrait aussi être liée à la présence de microorganismes spécifiques.

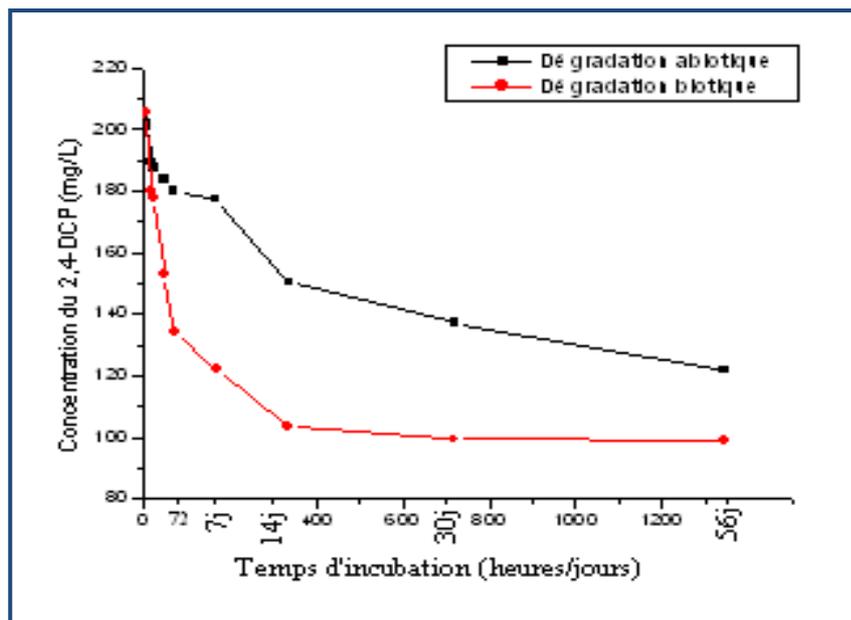
Après la phase de latence, la dégradation du 2,4-DCP démarre. Relativement rapide durant les 72 premières heures, avec une vitesse de dégradation de 0,4 mg par heure où on note une perte moyenne de 30 % de la concentration initiale du substrat pour l'ensemble des dilutions. Cette période de dégradation semble correspondre à la phase exponentielle de la croissance microbienne où les microorganismes se multiplient intensément. Ceci est confirmé par la présence de troubles microbiens dans tous les fermenteurs qui n'apparaissent qu'après 24 heures d'incubation.

Les chlorophénols en fortes concentrations inhibent toujours la croissance cellulaire, en agissant directement sur les oxygénases des microorganismes (11). Dans notre étude, le taux de la dégradation constaté dès les 72 premières heures indique que la croissance microbienne n'est pas inhibée, malgré l'utilisation d'une concentration plus élevée que celle d'autres auteurs (9,60, 62, 91). Cette situation dénote une grande efficacité du microbiote tellurique et surtout sa résistance spécifique.

Au bout de cette même période, on constate un changement de couleur du milieu de culture, initialement transparent. Des colorations bleues apparaissent dans les fermenteurs inoculés par les dilutions  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  et  $10^{-7}$  et jaunes pour les fermenteurs inoculés par la suspension de sol et  $10^{-1}$ . Au bout de 72 heures, tous les fermenteurs sont colorés par le vert, jaune et bleu (figure 7). D'après la littérature scientifique, les phénols sont facilement sensibles à un processus connu sous le nom d'auto-oxydation qui donne des complexes colorés (73). Ceci pourrait bien expliquer le changement de couleur du milieu qui semble être dû à l'auto-oxydation de métabolites issus de la dégradation du 2,4-DCP. En plus, la coloration jaune peut probablement être assignée à une éventuelle formation d'un produit de la *meta*-fission du noyau du 2,4-DCP, le 3-chlorocatéchol, indicatif de la présence d'une catéchol 2,3-dioxygénase (76). Par ailleurs, un dépôt argenté est également observé sur les pistons des seringues. Cette observation pourrait être la conséquence d'un dépôt d'éventuels métabolites spécifiques.



**Figure 8. Cinétique de la dégradation du 2,4-DCP dans le témoin stérile**



**Figure 9. Différence de la cinétique de dégradation biotique et abiotique**

Après 72 heures d'incubation, la concentration du 2,4-DCP continue à diminuer. Sa vitesse de biodégradation devient alors nettement plus faible, estimée à 0,2 mg par heure. Elle décroît ensuite progressivement jusqu'à devenir nulle après 30 jours. L'arrêt de la biodégradation n'est pas la conséquence de la mort de microorganismes, car leur viabilité est confirmée par la reprise de leur croissance sur un milieu solide, indiquée par la formation de colonies. Ces résultats peuvent être attribués à l'accumulation inhibitrice d'éventuels métabolites issus de la biodégradation ayant un effet bactériostatique sur le microbiote puisqu'il peut reprendre sa croissance. D'après plusieurs auteurs, le 3-chlorocatéchol (coloration jaune) est considéré comme un substrat intermédiaire qui se produit via la *meta*-fission du 2,4-DCP par l'enzyme *meta*-pyrocatéchase. Il génère à son tour un halogénure d'acyle qui réagit avec l'enzyme en provoquant une inactivation suicide (77). L'éventuelle formation de ce métabolite pourrait être associée à l'arrêt de la biodégradation.

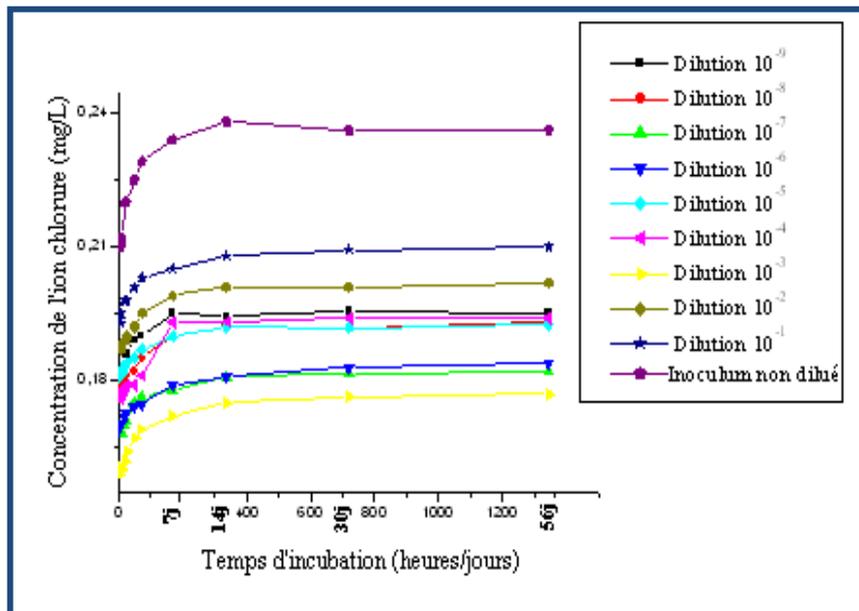
Enfin d'incubation (56 jours), aucune biodégradation n'est constatée et elle reste alors toujours nulle. Le pourcentage de la biodégradation du 2,4-DCP après 56 jours atteint 52% au maximum pour l'ensemble des dilutions. La minéralisation est une biodégradation complète des molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) (17). Cependant, aucune production de gaz n'est observée dans nos fermenteurs, ce qui suggère que le substrat n'est pas minéralisé et pourrait être transformé en sous produits dérivés. La différence de la biodégradation entre les dilutions est non significative ( $p > 0,05$ ) (annexe 7). La biodégradation par toutes les dilutions (inoculum non dilué- $10^{-9}$ ) suit le même rythme. Selon plusieurs auteurs, une grande quantité de biomasse peut éliminer des concentrations élevées de polluants, car la concentration du polluant par cellule est alors faible (92). Dans notre cas, la charge de notre inoculum n'a pas un effet sur la biodégradation du 2,4-DCP. Le pourcentage de la biodégradation obtenu par l'inoculum non dilué est le même que celui obtenu par la dilution la plus avancée ( $10^{-9}$ ). Cette situation pourrait être expliquée dans notre étude par le fait que le consortium responsable de cette dégradation pourrait être constitué de microorganismes très efficaces, présents dans toutes les dilutions. Parallèlement, il semble qu'il y a une interaction positive entre les populations microbiennes du microbiote tellurique qui serait responsable de l'élimination de la concentration du 2,4-DCP. La situation d'inhibition au terme de 30 jours de la dégradation du 2,4-DCP, constatée dans notre étude, ne se produit probablement pas en milieu naturel. En effet nos fermenteurs d'étude sont des milieux clos qui permettent l'accumulation de dérivés métaboliques inhibiteurs, alors que le sol est un milieu ouvert qui dilue en permanence tous ces composés. L'inhibition ne résulte pas d'une évolution défavorable de paramètres physico-chimiques du milieu: le pH qui évolue peu et la température reste constante.

Outre la possibilité de production métabolique de dérivés plus toxiques que le substrat, il ya lieu de considérer comme cause fort probable de l'arrêt de la croissance microbienne par l'épuisement du principal facteur limitant du milieu: l'oxygène.

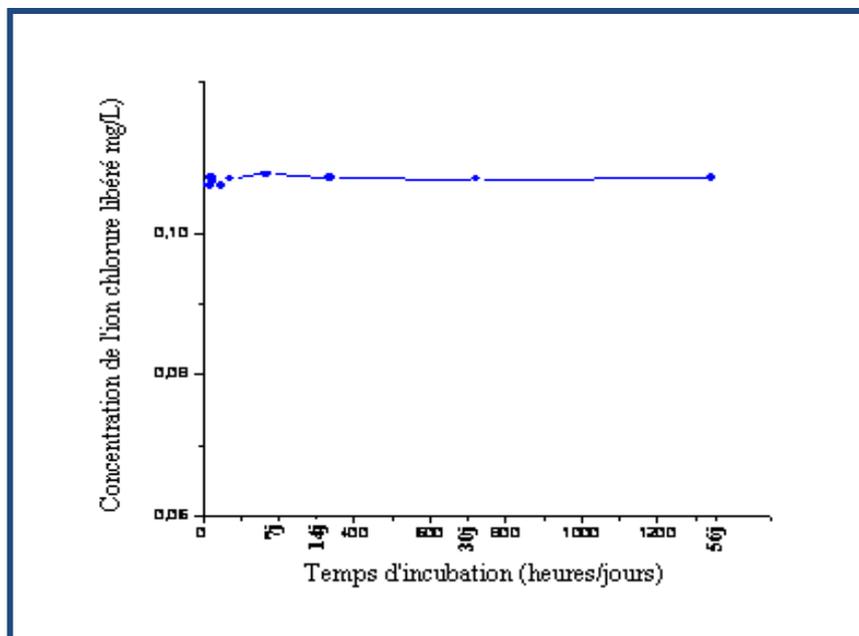
Dans les fermenteurs non inoculés (témoin stérile), la concentration du 2,4-DCP suit une diminution selon un profil graduel (figure 8). Au bout de 56 jours (fin d'incubation), 40% de la concentration initiale du 2,4-DCP sont éliminés. Dans le sol, le 2,4-DCP peut disparaître par évaporation (5, 10, 54, 62) ou photo-décomposition (83). Ces processus pourraient bien expliquer la diminution du 2,4-DCP dans le témoin stérile. Mais, dans notre étude, la photo-décomposition pourrait ne pas avoir un effet sur la disparition du 2,4-DCP car les fermenteurs sont incubés à l'obscurité. L'évaporation est certainement impliquée mais pas de manière prépondérante car le milieu est fermé et son volume d'air est limité. Le taux de dégradation abiotique relativement élevé du 2,4-DCP ne peut donc résulter de sa photo-décomposition ou de son évaporation mais de processus physico-chimiques différents qui restent à déterminer.

Notons, cependant, que l'hydrolyse du 2,4-DCP n'est pas un processus abiotique à retenir vu que l'absence de groupes fonctionnels hydrolysables rend le 2,4-dichlorophénol faiblement hydrolysé dans l'eau (32). En plus, le milieu stérile garde sa couleur initiale, ce qui indique que le changement de couleur constaté dans les fermenteurs inoculés n'est pas la conséquence d'une auto-oxydation du 2,4-DCP et pourrait être dû plutôt à l'auto-oxydation des métabolites issus de la biotransformation du 2,4-DCP.

Contrairement à la biodégradation, la concentration du 2,4-DCP continue à diminuer abiotiquement (fermenteurs stériles) après 30 jours d'incubation mais ce processus reste faible. La différence entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est très significative ( $p < 0,05$ ) (annexe 8). Il est donc clairement établi que la diminution de la concentration du 2,4-DCP est causée principalement par l'activité biologique des microorganismes du milieu.



**Figure 10. Cinétique de libération de l'ion chlorure pendant la biodégradation (Inoculum non dilué -10<sup>-9</sup>)**



**Figure 11. Cinétique de la libération de l'ion chlorure dans les fermenteurs stériles**

### 3. Cinétique de libération de l'ion chlorure

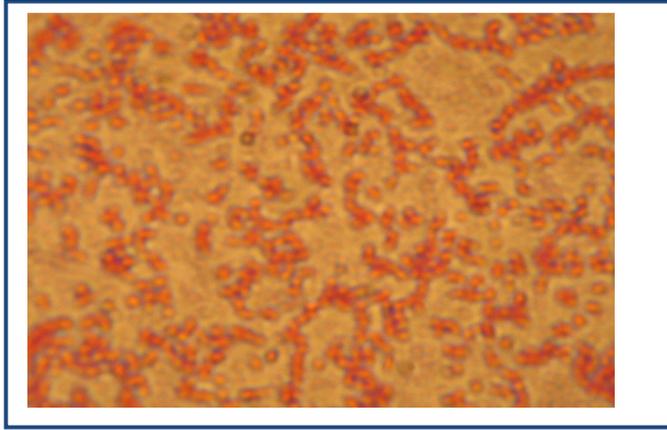
La figure 10 montre la cinétique de libération de l'ion chlorure pendant la biodégradation du 2,4-DCP dans les différentes dilutions. Pendant la phase de latence, aucune libération de l'ion chlorure n'est constatée mais elle est intense pendant les premières 72 heures où la biodégradation est à son maximum. L'ion chlorure continue à se libérer dans le milieu progressivement jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour où sa libération devient nulle. Sa concentration reste alors stable jusqu'à la fin d'incubation. D'après nos résultats, il s'avère que la libération de l'ion chlorure et la biodégradation prennent place en parallèle, pendant la phase exponentielle de la croissance microbienne. Cette situation suppose qu'au cours de la phase active, la molécule du substrat subit une déchloration mais faible, seulement de 7%. En effet, la biodégradation du 2,4-DCP est corrélée positivement avec la libération de l'ion chlorure.

La libération de l'ion chlorure dans le milieu est non stœchiométrique, seulement 11% au maximum après 56 jours pour l'ensemble des dilutions, une libération stœchiométrique étant seulement constatée dans le cas d'une minéralisation (93,94). Ce qui explique clairement encore que le 2,4- DCP n'est pas minéralisé et semble être plutôt biotransformé en sous produits dérivés. Ces sous produits sont probablement un mélange de composés mono, di ou non chlorés, dérivés de la molécule mère.

Le pH des cultures est un paramètre important dans la dégradation des chlorophénols, une légère diminution du pH est toujours observée à des concentrations élevées du 2,4- DCP (10). C'est le cas aussi pour notre étude où le pH diminue faiblement, de 6,8 à 6,7. D'autres auteurs observent la même situation (7). Dans la biodégradation des chlorophénols, la diminution du pH est toujours corrélée à la libération de l'ion chlorure et à la formation concomitante de l'acide chlorhydrique (HCl) (10). Dans notre étude, la déchloration du 2,4-DCP est faible, c'est pourquoi seule une légère diminution du pH est constatée.

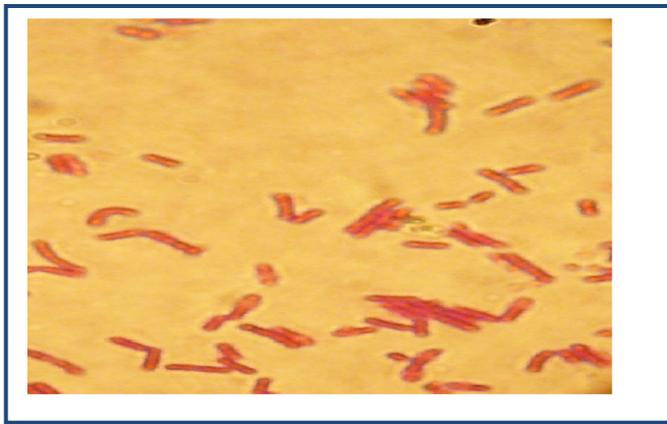
Concernant le témoin stérile, aucune libération n'est constatée (figure 11). Le pH ne diminue pas, la même valeur initiale du milieu est gardée (6,8). Ce qui prouve que la molécule en conditions abiotiques n'est pas déchlorée. Cependant, une éventuelle disparition par volatilisation ou autre reste possible.

**A**



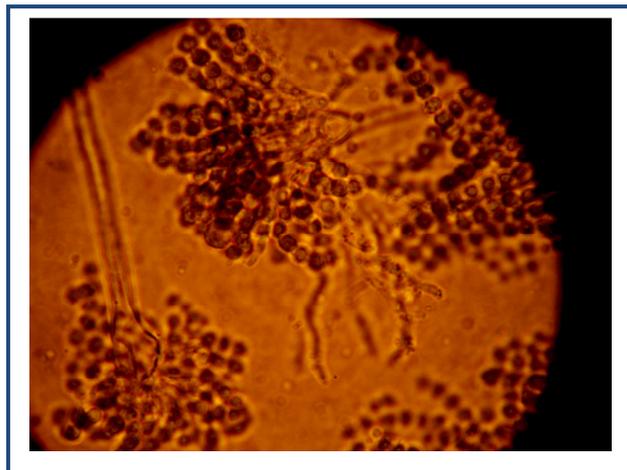
**Forme cocci**

**B**



**Forme bacillaire**

**C**



**Forme fongique**

**Figure 12. Aspect microscopique des souches microbiennes isolées**

## 4. Isolement et identification des souches responsables de la dégradation

La recherche de groupements microbiens dominants, impliqués dans le phénomène de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol, donne 10 colonies de bactéries aérobies d'aspects macroscopiques différents. Une souche fongique est également isolée. Tous ces isolats sont capables de se développer sur le milieu minimum solide contenant le 2,4-dichlorophénol comme seule source de carbone et d'énergie. Ces résultats confirment bien la capacité de ses souches à dégrader 2,4-dichlorophénol comme seule source de carbone et d'énergie.

### 4.1. Observation microscopique

- **Forme fongique:** La forme des hyphes de la souche fongique est représentée dans la figure 12.C. L'identification du genre fongique est réalisée grâce à la forme de la tête des hyphes. Les têtes sont conidiennes, claviformes et dressées, de couleur verte. Cette souche est identifiée comme *Aspergillus* sp. (86).
- **Souches bactériennes:** à l'état frais, 3 bactéries apparaissent sous forme de cocci et 7 de bacilles, 3 d'entre elles produisent des pigments diffusibles sur gélose. Les 4 bacilles qui ne produisent pas de pigments apparaissent immobiles. Le reste des formes sont mobiles. L'observation au microscope après la coloration de Gram révèle que toutes les bactéries sont à Gram négatif (figure 12.A et 12.B).

### 4.2. Critères biochimiques et physiologiques des souches bactériennes isolées

- **Type respiratoire**

Toutes les souches sont aérophiles.

- **Recherche de la cytochrome oxydase**

Parmi les 10 souches isolées, 4 d'entre elles apparaissent oxydase négative.

### - **Hydrolyse de la cellulose**

Aucune zone de lyse n'est observée pour toutes les souches isolées, ceci indique que ces espèces bactériennes ne possèdent pas de cellulase et sont donc incapables d'une activité cellulolytique.

### - **Réduction de nitrate en nitrite**

Les résultats de la recherche de la nitrate réductase montrent que les 10 souches isolées présentent une réaction négative (pas de coloration rouge), donc incapables de réduire le nitrate en nitrite.

### - **Production d'indole**

Pour tous les isolats, aucune apparition d'anneau rouge n'est remarquée. Les souches bactériennes sont incapables de produire l'indole (indole négative).

### - **Mise en évidence de la production de pigments spécifiques**

Parmi les 10 souches isolées, 3 produisent des pigments diffusibles sur gélose nutritive (coloration verte). Une réponse positive est obtenue pour ces trois souches pour les tests de production de la pyoverdine et négative concernant la production de la pyocyanine. Ces trois souches appartiennent donc au genre *Pseudomonas* sp. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est à exclure car la production de la pyocyanine lui est spécifique.

Concernant les autres 7 isolats bactériens restants, après la comparaison de leurs critères morphologiques, physiologiques et biochimiques avec le Bergey's Manuel (95). Les bactéries en cocci appartiennent au genre *Alcaligenes* sp., alors que les bacilles sont probablement du genre *Acinetobacter* sp.

La toxicité du 2,4-dichlorophénol est responsable, dans tous les types de milieux, de l'élimination d'une part importante de leur microbiote et elle a certainement causé la mort d'une grande partie de la population microbienne. Mais ces 4 genres microbiens ont facilement résisté à la toxicité du 2,4-dichlorophénol présent en forte concentration dans le milieu. Ces microorganismes sont connus pour leur aptitude à dégrader les substances aromatiques (27, 90, 96, 97, 98, 99). Cette propriété pourrait expliquer leur présence prépondérante dans le sol étudié qui a une longue histoire avec le 2,4-D.

# Discussion générale et conclusion



Notre travail avait comme but à mettre en évidence la capacité du microbiote tellurique à dégrader des polluants organiques xénobiotiques. Le 2,4-dichlorophénol est le polluant le plus fréquemment rencontré dans les sols agricoles, suite à leurs traitements par le 2,4-D. Ce dernier est largement utilisé en agriculture comme herbicide et le 2,4-dichlorophénol est son produit majeur de dégradation biologique et photocatalytique. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous l'avons choisi comme modèle. Dans ce cadre, la capacité des microorganismes du sol à dégrader le 2,4-dichlorophénol est testée dans un milieu minimum où il est la seule source de carbone et d'énergie, ajouté à une concentration de 200 mg/L. Cette culture est effectuée dans des fermenteurs miniaturés, menée en batch et incubée à 30°C sans agitation. Nous avons adapté ce système de culture pour suivre la cinétique de biodégradation du 2,4-dichlorophénol et mesurer qualitativement et quantitativement les gaz fermentaires produits lors d'une éventuelle minéralisation du 2,4-dichlorophénol.

L'étude de la biodégradation montre que le microbiote tellurique utilise le 2,4-dichlorophénol comme seule source de carbone et d'énergie. Cette biodégradation prend place après une période d'adaptation du microbiote au 2,4-dichlorophénol, relativement courte. Cela pourrait s'expliquer par un synergisme présent entre les populations microbiennes. De plus, le sol, d'où provient l'inoculum, contient déjà des phénols. Certains échanges génétiques ou induction de système enzymatique pourraient être effectués et sont probablement responsables de l'adaptation rapide du microbiote au 2,4-dichlorophénol. Cette situation pourrait aussi être liée à la présence de microorganismes spécifiques. Malgré la concentration élevée du 2,4-dichlorophénol, la croissance microbienne n'est pas inhibée. Cette observation s'avère clairement par le taux de la biodégradation constaté pendant la première semaine. Ce qui représente une efficacité certaine du microbiote tellurique à dégrader ce composé.

Un arrêt de la biodégradation est noté après 30 jours d'incubation. La cause de cette biodégradation incomplète n'est pas due à la mort des microorganismes car leur viabilité est confirmée. Ce résultat pourrait être assigné à l'augmentation de la toxicité due à l'accumulation de produits intermédiaires. Par ailleurs, notre culture en batch suggère aussi comme cause majeure de l'arrêt de la croissance microbienne l'épuisement de l'oxygène, facteur limitant principal du milieu de culture. Les taux de la biodégradation obtenus par l'inoculum non dilué et ses diverses dilutions sont très semblables et indique que la charge en microorganismes n'a pas un effet accélérateur sur la biodégradation. Cette situation confirme une nouvelle fois la capacité du microbiote tellurique à dégrader un polluant d'un site pollué quelle que soit la concentration des microorganismes.

Le 2,4-dichlorophénol suit en parallèle une diminution par voie abiotique (témoin stérile), notée à 40% sans libération de l'ion chlorure et par conséquent un pH restant stable. Dans notre étude, la photodécomposition et l'évaporation ne jouent pas un rôle prépondérant dans l'élimination abiotique du 2,4-DCP, contrairement au sol considéré en conditions naturelles. Cette perte abiotique pourrait être le résultat d'autres processus physico-chimiques différents qui restent à déterminer.

Le 2,4-DCP est partiellement dégradé à hauteur de 52% au maximum après 56 jours. Cette dégradation est principalement le fait du microbiote tellurique, puisque sa dégradation abiotique (témoin stérile) reste faible.

Aussi bien en conditions biotiques qu'abiotiques, le 2,4-DCP n'est pas minéralisé, car aucune production de gaz n'est constatée dans nos fermenteurs où on observe une libération non stœchiométrique de l'ion chlorure. Sa dégradation signifie donc probablement sa biotransformation en sous produits dérivés. En effet, la faible déchloration de la molécule du 2,4-dichlorophénol suggère que les métabolites ainsi formés pourraient être des composés mono ou dichlorés. Mais ce résultat est très peu convaincant. Seule l'identification des métabolites apportera la réponse à cette situation.

L'identification des groupements microbiens impliqués dans la biodégradation du 2,4-dichlorophénol révèle la présence de 4 genres dominants: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Acinetobacter* sp. et *Aspergillus* sp. Ces 4 souches prouvent leur capacité à utiliser le 2,4-dichlorophénol comme élément nutritionnel. Cette efficacité à dégrader le 2,4-dichlorophénol pourrait s'expliquer par l'activité différente et complémentaire (participation associative) de ces souches dans le milieu. On entend par là que certaines activités métaboliques spécifiques pourraient être présentes et qu'il serait utile de les déterminer.

Ces résultats préliminaires indiquent donc la possibilité d'utiliser ces souches microbiennes dans la protection de l'environnement. Ils permettent également d'envisager avec plus d'optimisme, l'atteinte de l'objectif d'une dégradation complète et rapide du 2,4-dichlorophénol. D'autant qu'il ne faut pas écarter la possibilité que ces souches puissent adéquatement dégrader d'autres polluants organiques résistant dans l'environnement.

Certaines autres perspectives peuvent être envisagées afin de continuer ce travail:

- ❖ Identification des sous produits de la biotransformation du 2,4-dichlorophénol.
- ❖ Identification avancée des souches isolées jusqu'au rang de l'espèce et confirmation de l'identification par l'emploi des outils du génie génétique.
- ❖ Sélection, sur l'optique de cette caractérisation des souches servant pour minéraliser le 2,4-dichlorophénol et autres micropolluants organiques visant leur utilisation comme biocatalyseurs dans la détoxification de l'environnement.

# Références bibliographiques



1. **Calvet R., 2000.** Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), 83-90
2. Monferran M. V., Echenique J. R. & Wunderlin D. A., 2005. **Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer.** *Chemosphere*, 61: 98-106.
3. **Atuanya E. I. & Chkrabarti T., 2003.** Kinetics of biotransformation of 2,4-dichlorophenol using UASB-reactor. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96: 129–141.
4. Herrera Y., Okoh A. I., Norma L. A. & Trejo-Hernández M. R., 2008. **Biodegradation of 2,4-dichlorophenol by a *Bacillus* consortium.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 55-60.
5. **Moreira J. L., Polidoro A. M., Heitor C., Nunes O. C., Alves A. & Santos L., 2006.** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol in an aerobic reactor. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15 (4): 289-294.
6. **Sahinkaya E. & Dilek F. B., 2002.** Effects of 2,4-dichlorophenol on activated sludge. *Applied Microbiological Biotechnology*, 59: 361-367.
7. **Sahinkaya E. & Dilek F. B., 2007.** Biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenol by acclimated mixed cultures. *Journal of Biotechnology*, 127: 716-726.
8. **Matafonova G., Shirapova G., Zimmer C., Giffhorn F., Batoev V. & Kohring G. W., 2006.** Degradation of 2,4-dichlorophenol by *Bacillus* sp. isolated from an aeration pond in the Baikalsk pulp and paper mill (Russia). *International Biodeterioration and Biodegradation*, 58: 209-212.
9. **Tyler J. E & Finn R. K., 1974.** Growth rates of *Pseudomonas* on 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-Dichlorophenol. *Applied Microbiology*, 28 (2): 181-184.
10. **Vroumsia T., Steiman R., Siegle-Murandi F. & Benoit-Guyod J.L., 2005.** Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP). *Chemosphere*, 60: 1471-1476
11. **Ziagova M. & Liakopoulou-Kyriakides M., 2007.** Kinetics of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-*m*-cresol degradation by *Pseudomonas* sp. Cultures in the presence of glucose. *Chemosphere*, 68 (5), 921-927.
12. **Atlas R. M. & Bartha R., 1992.** Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3<sup>rd</sup> edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), 563.
13. **Quénéa K., 2004.** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
14. **Paul E. A. & Clark F. E., 1996.** Soil microbiology and biochemistry. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.

15. **Artiola-Fortuny J. & Fuller W.H., 1982.** Adsorption of some mono-hydroxybenzene derivatives by soils. *Soil Science*, **133**: 218-227
16. **Crosnier J., 1999.** Devenir de la pollution métallique drainée par les eaux pluviales, influence du compartiment microbien et des alternances de dessiccation/réhumectation sur le transfert du zinc dans la zone non saturée du sol. Thèse de Doctorat. Université de Claude Bernard – Lyon I (France).
17. **Alexander, M., 1994.** Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).
18. **Bousseboua H., 2005.** Eléments de microbiologie. Campus-Club, Algérie, (2<sup>ème</sup> Edition), 179-199.
19. **Soulas G., Codaccioni P. & Fournier J. C., 1983.** Effect of crosstreatment on the subsequent breakdown of 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T in the soil. Behaviour of the degrading microbial populations. *Chemosphere*, **12 (7/8)**: 1101-1106.
20. **Chassin P., Baize D., Cambier Ph. & Sterckeman T., 1996.** Les éléments traces métalliques et la qualité des sols : impact à moyen et à long terme. Forum « le sol un patrimoine menacé ? ». Paris (France), 297-303.
21. **Ramade R., 2000.** Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international. Paris (France), 58-365
22. **Jeannot, R., Lemièrre B., Chiron S. Augustin F. & Darmendrail D., 2000.** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. France.
23. **Boucheseiche C., Cremille E., Pelte T. & Pojer K., 2002.** Pollution toxique et écotoxicologique : notions de base. Guide technique N°7. Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, Montpellier (France).
24. **Mérian E., 1991.** Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis and biological relevance. Wiley-VCH, Weinheim (Allemagne).
25. **Eshghi Malayri B., 1995.** Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes. Thèse de Doctorat. Université de Nancy1 (France).
26. **Chu W., Kwan C. Y., Chan K. H. & Kam S. R., 2005.** Kinetics modeling and reaction pathway of 2, 4-dichlorophenol transformation by photo-fenton-like oxydation. *Journal of Hazardous Materials*, **121**: 119-126.
27. **De S., Pramanik S. K., Williams A. L. & Dutta S. K., 2004.** Toxicity of polychlorobiphenyls and its Bioremediation. *International Journal of Human Genetics*, **4 (4)**: 281-290
28. **Barriuso E., Calvet R., Schiavon M & Soulas G., 1996.** Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformation et dissipation. Forum le sol, un patrimoine menacé? Paris (France), 279-292.

29. **Lalanne F. 2006.** Etude des potentialités du lavage biologique pour le traitement d'un mélange complexe de composés volatils. Thèse de Doctorat. L'université de Pau et des Pays de l'Adour (France).
30. **Dobbins, D.C., Thornton-Manning J., Jones D.D. & Federle T.W., 1987.** Mineralization potential for phenol in subsurface soils. *Journal of Environmental Quality*, **16**: 54–58.
31. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1999.** Toxicological profile for chlorophenols. Department of health and human services, public health service. Atlanta, GA (USA).
32. **Puhatika J. A. & Jarvinen K., 1992.** Aerobic fluidized-bed treatment of polychlorinated phenolic wood preservative constituents. *Water Resources*, **26**: 765-770.
33. **Fdil F. 2004.** Etude de la biodégradation des herbicides chlorophenoxy alcanoïques par des procédés photochimiques et électrochimiques, applications environnementales. Thèse de Doctorat. Université de Marne-La-Vallée (France).
34. **Kankou Mohamed Ould Sid Ahmed., 2004.** Vulnérabilité des eaux et des sols de la rive droite du fleuve Sénégal en Mautitanie-Etude en laboratoire du comportement de deux pesticides. Thèse Doctorat. Université de Limoges (France).
35. **Fava L., Orrù M. A., Crobe A., Barra Caracciolo A., Bottoni P. & Funari E., 2005.** Pesticides metabolites as contaminants of ground water resources: assessment of the leaching potential treatment of endosulfan sulphate, 2,6-dichlorobenzoic acid, 3,4-dichloroaniline, 2,4-dichlorophenol and 4-chloro-2-methyl phenol. *Microchemical journal*, **79**: 207-211.
36. **Gendrault S., 2004.** Etude d'un traitement combiné bio-physico-chimique pour la décontamination des eaux polluées en atrazine. Thèse de Doctorat. Institut national des sciences appliquées de Lyon (France).
37. **Fournier J. C., Soula G. & Parekh N., 1996.** Main microbial mechanisms of pesticides degradation in soil. In : soil Ecotoxicology, Chapitre 4, CRC Press, Lewis Publishers (USA).
38. **Himel C. M., Loats H. & Bailey G. W., 1990.** Pesticides sources to the soil and principales of spray physics. In: pesticides in the soil environment: processes, impacts and modelling. SSSA Book series 2. Edition Cheng, Madison, Wisconsin (USA), 88-89.
39. **Scheyer A., 2004.** Développement d'une méthode d'analyse par CPG/MS/MS de 27 pesticides identifiés dans les phases gazeuse, particulaire et liquide de l'atmosphère. Application à l'étude des variations spatio-temporelles des concentrations dans l'air et dans les eaux de pluie. Thèse de Doctorat. Université de Louis Pasteur de Strasbourg (France).
40. **Männistö M. K., Tirola M. A., Salkinoja-Salonen M. S., Kulomaa M. S. & Puhakka J. A., 1999.** **Diversity of chlorophenol degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater.** *Archives of microbiology*, **171**: 189-197.

41. **International Uniform Chemical Information Database (IUCLID), 2002.** 2,4-Dichlorophenol sodium salt, data set. The Dow Chemical Company.
42. **Djebbar K. E., 2002.** Transformation directe et indirecte de deux herbicides le 2,4-D et le Diuron en solution aqueuse. Doctorat d'état en chimie. Université Mentouri, Constantine (Algérie).
43. **Migrain I., Green G. A. & Monteil H., 1993.** Degradation of atrazine in laboratory microcosms: isolation and identification of the biodegrading bacteria. *Environmental Toxicological and Chemistry*, **12**: 1627-1637.
44. **Kaufmann k., 2004.** Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).
45. **Laperto M., 2006.** A strategy for xenobiotic removal using photocatalytic treatment, microbial degradation or integrated photocatalytic-biological process. Ecole polytechnique fédérale de Lausanne (France).
46. **Pichard A., Bisson M., Bureau J., Dujardin R., Lacroix G., Lefevre J. P., Oberson-Geneste D., Strub M. P. & Tissot S., 2005.** 2,4-dichlorophénol. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. Version N° 3-1. I N E R I S (France): 1-35.
47. **Hazardous Substances Data Bank (HSDB), 1994.** Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine, National Toxicology Information Program, Bethesda, MD (USA).
48. **Dow AgroSciences, 1999.** 2,4-dichlorophenol-Safe handling guide. Dow AgroSciences limited liability company (LLC), USA.
49. **Hoak R.D., 1957.** The causes of tastes and odors in drinking water. *Water & Sewage Works*, **104**: 243-247.
50. **Ruth J.H., 1986.** Odor thresholds and irritation levels of several chemical substances: A review. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **47**: 141-151.
51. **Hempfling R., Doetsch P., Stubenrauch S., Mahr A., Bauer D., Koschmieder H.J. & Grünhoff D., 1997.** USM-System zur Atlantenbeurteilung, Instrumente für die pfadübergreifende Abschätzung und Beurteilung von atlasverdächtigen Flächen. Institut Fresenius. Erlangen & Focon-Ingenieurgesellschaft, Aachen (Allemagne).
52. **Merck, 1996.** The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 12<sup>th</sup> edition. Ralway, N.J., Merck and Co., Inc. (USA).
53. **Gujer, W. & Zehnder, A. J. B., 1983.** Conversion process in anaerobic digestion. *Water Science and Technology*, **15**: 127-167.
54. **ULLMANN'S., 1991.** Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5<sup>th</sup> edition. VCH Verlagsgesellschaft (Germany), 415-419

55. **United States Environmental Protection Agency (US EPA), 1996.** Soil Screening Guidance: Technical Background Document. Washington (USA). <http://www.epa.gov/epahome/search.html>.
56. **Contreras Iglesias S., 2002.** Degradation and biodegradability enhancement of nitrobenzene and 2,4-dichlorophenol by means of advanced oxidation processes based on ozone. Thèse de Doctorat. Université de Barcelone (Espagne).
57. **International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1987.** Pentachlorophenol. Environmental health criteria 71. World Health Organisation. Geneva (Suisse).
58. **Ando K., Kato A. & Suzuki S., 1970.** Isolation of 2,4-dichlorophenol from a soil fungus and its biological significance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **39 (6)**: 1104-1107.
59. **Sithole B. B. & Williams D. T., 1986.** Halogenated phenols in water at forty canadian potable water treatment facilities. *Journal of association of analytical chemistry*, **69 (5)**:807-810.
60. **Essam T., Zilouei H., Amin Magdy A., El tayed O., Mattiasson B. & Guieyese B. 2006.** Sequential UV-biological degradation of chlorophenols. *Chemosphere*, **63**: 277-284.
61. **Czaplicka M. & Kaczmarczyk. B., 2006.** Infrared study of chlorophenols and products of their photodegradation. *Talanta*, **70**: 940- 949.
62. **Nakagawa A., Osawa S., Hirata T., Yamagishi Y., Hosoda J. & Horikoshi T., 2006.** 2,4-dichlorophenol degradation by the soil fungus *Mortierella* sp. *Bioscience of Biotechnology and Biochemistry*, **70 (2)**: 525-527.
63. **Paasivirta 3, Heinola K., Humppi T., 1985.** Polychlorinated phenols, guaiacols and catechols in environment. *Chemosphere*, **14**:469-491.
64. **Krijghsheld K.R. & Van der Gen A., 1986.** Assessment of the impact of the emission of certain organochloride compounds on the aquatic environment. Part I: Monochlorophenols and 2,4-dichlorophenol. *Chemosphere*, **15 (7)**: 825-860.
65. **Crosby D. K., 1981.** Environment chemistry of pentachlorophenol. *Pure Applied Chemistry*, **53**: 1051-1080.
66. **Crespin M. A., Gallego M. & Valcarel M. 2001.** Study of the degradation of the herbicides 2,4-D and MCPA at different depths in contaminated agricultural soil. *Environmental Science and Technology*, **35**: 4265-4270
67. **Pelmont J., 2005.** Biodégradations et métabolismes : les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences. France, 593.
68. **Jensen J., 1996.** Chlorophenols in the terrestrial environment. *Environmental Contamination and Toxicology*, **146**: 25-51.
69. **Jones P.A., 1981.** Chlorophenols and their impurities in the Canadian environment, Environmental Protection Service (Report No. EPS-3-EC-81-2). Ottawa (Canada), 434.

70. **Manoharan R., Harper S. C., Mavinic D. S., Randal C. W., Wang G. & Marickovch D. C., 1992.** Inferred metal toxicity during the biotreatment of high ammonia landfill leachate. *Water and Environmental Resources*, **64**: 858-865.
71. **Witthulum B., Klauth P., Klumpp E., Narres H. D & Martinius H., 2005.** Sorption and biodegradation of 2,4-dichlorophenol in the presence of organoclays. *Applied clays science*, **28**: 55-66.
72. **Scow K. Goyer M., Perwak J., Thomas R., Wallace D. & Wood M., 1982.** Exposure and risk assessment for chlorinated phenols (2-chlorophenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol). Arthur D. Little, Cambridge, MA (USA).
73. **Baker M.D & Mayfield C. I. 1980.** Microbial and non biological decomposition of chlorophenols and phenol in soil. *Water, Air and Soil Pollution*, **13**: 411-424
74. **Steiert J.G. & Crawford R.L., 1985.** Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends in Biotechnology*, **3 (12)**: 300-305.
75. Liao Y., Zhou X., Yu J., Cao Y., Li X. & Kuai B., 2006. **The key role of chlorocatechol 1,2-dioxygenase in phytoremoval and degradation of catechol by *Transgenic Arabidopsis*.** *Plant Physiology*, **142**: 620-628.
76. **Koh S. C., McCullar M. V & Focht D., 1997.** Biodegradation of 2,4-dichlorophenol through a distal *meta*-fission pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, **63 (5)**: 2054-2057
77. **Reineke W. & Knackmuss H. J., 1980.** Hybrid pathway of chlorobenzoate metabolism in *Pseudomonas* sp. B13 derivatives. *Journal of Bacteriology*, **142**: 467-473.
78. **Xiaoming Z. & Wiegel J., 1990.** Sequential anaerobic degradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 1119-1127.
79. **Isensee A.R. & Jones G. E., 1971.** Absorption and translocation of root and foliage applied 2,4-dichlorophenol, 2,7-dichlorodibenzo-*p*-dioxin, and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, **19 (6)**: 1210-1214.
80. **Soderstrom M., Wachtmeister C. A. & Forlin L., 1994.** Analysis of chlorophenolics from bleach Kraft mill effluent (BKME) in bile of perch (*Perca fluviatilis*) from the baltic also measuring chlorocatechols. *Chemosphere*, **28 (9)**: 1701-1719.
81. **Digiovanni G. D., Neilson J. W., Pepper I. L. & Sinclair N. A., 1996.** Gene Transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 Plasmid pJP4 to Indigenous Soil Recipients. *Applied and Environmental Microbiology*, **62 (7)**: 2521-2526.
82. Rocio Estrella M., Brusseau M. L., Maier R. S., Pepper I. L., Wierenga P. J. & Miller R. M., 1993. **Biodegradation, sorption, and transport of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in saturated and unsaturated soils.** *Applied and Environmental Microbiology*, **59 (12)**: 4266-4273.

83. 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.** *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (4): 1106-1115.
84. Farrell A. & Quilty B., 1999. Degradation of mono-chlorophenols by a mixed microbial community via a *meta*-cleavage pathway. *Biodegradation*, 10: 353-362.
85. Lang E. & Viedt H., 1994. **Degradation and toxicity to bacteria of chlorinated phenols and benzenes, and hexachlorocyclohexane Isomers.** *Microbial Ecology*, 28: 53-65.
86. Botton B., Breton A., Fevre M., Guy Ph., Larpent. & Veau P., 1985. Moisissures utiles et nuisibles (importance industrielle). Masson (France), 48-98.
87. Joffin J. N. & Leyral G., 1995. Microbiologie technique (Dictionnaire des techniques) Tome 1. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine. Bordeaux (France), 185.
88. Brizzio S., Turchetti B., Garcia V., Libkind D., Buzzini P., Brook M., 2007. Extracellular enzymatic activities of basidiomycetous yeasts isolated from glacial and subglacial waters of northwest Patagonia (Argentina). *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 519-525.
89. Kargi F. & Erker S., 2004. **Toxicity and batch biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenol by pure *Pseudomonas putida* culture.** *Enzyme and microbial Technology*, 35: 424-428.
90. Stoilova I., Krastanov A. & Bui H., 2008. **Biodegradation of mixed phenolic compounds by a microbial association of *Aspergillus awamori* and *Thermoascus aurantiacus*.** *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7 (12): 2625-2633.
91. Essam T., Amin Magdy A., El tayeb O., Mattiasson B. & Guieyese B., 2007. Sequential photochemical-biological degradation of chlorophenols. *Chemosphere*, 66: 2201-2209.
92. Fackurddin A. N. M. & Quilty B., 2005. The influence of glucose and fructose on the degradation of 2-chlorophenol by *Pseudomonas putida* CP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 1541-1548.
93. Shiu W. Y, Ma K. C. & Varhanickova D., 1994. **Chlorophenols and alkylphenols: A review and correlation of environmentally relevant properties and fate in an evaluative environment.** *Chemosphere*, 29 (6):1155 -1224.
94. Wang S. J. & Loh K. C., 1999. **Modeling the role of metabolic intermediates in kinetics of phenol biodegradation.** *Enzymes Microbial technology*, 25: 177-184.
95. Holt J. G., Krieg N. R., Sneath. P. H. A., Staly J. T., Williams S. T., 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> edition. The Williams and Wilkins Co., Baltimore (USA).
96. Kim M. H. and Hao O. J., 1999. **Cometabolic degradation of chlorophenols by *Acinetobacter* species.** *Water resources*, 33 (5): 62-74.

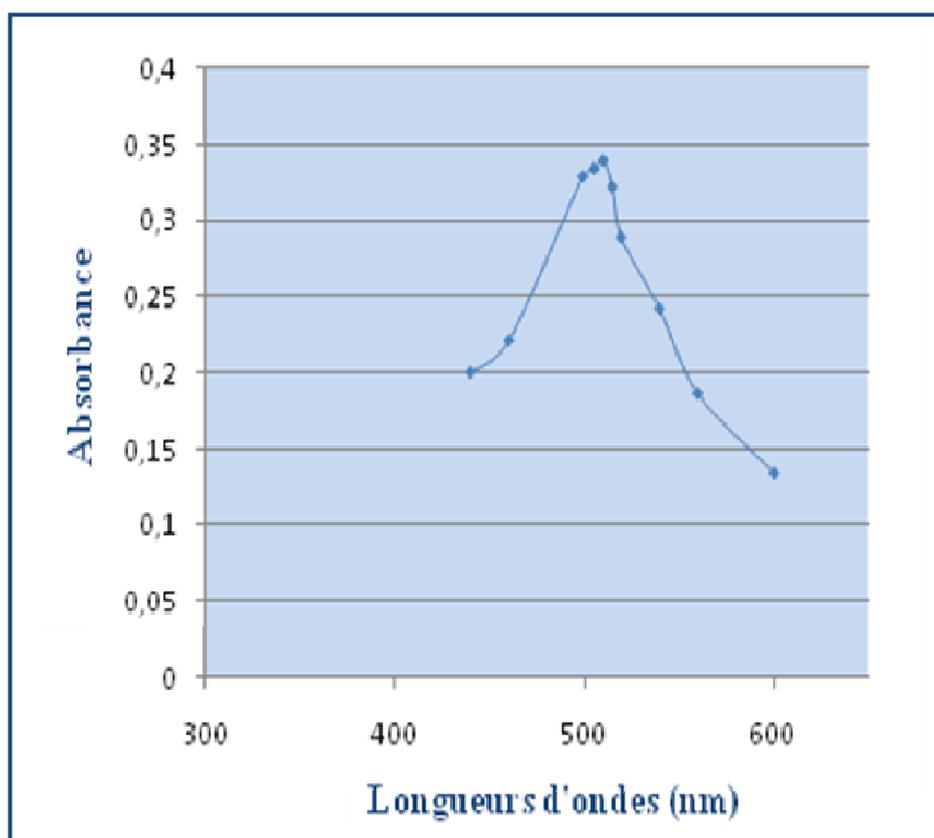
97. Mars A. E., Kasberg T., Kaschabek S. R., Van Agteren M. H., Janssen D.B. and Reineke W., 1997. **Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the *meta*-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene.** *Journal of bacteriology*, 179: 4530-4537.
98. Shin S. K., Kim J. E., Kwon G.S., Kwon J. W., Oh E. T., So J. S. & Koh S. C., 2003. **Isolation and identification of a pentachloronitrobenzene (PCNB) degrading bacterium *Alcaligenes xylooxidans* PCNB-2 from Agricultural Soil.** *The Journal of Microbiology*, 41 (2):165-168.
99. **Sahinkaya E. & Dilek F. B., 2006.** Biodegradation of 4-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol mixture in a rotating biological contactor (RBC). *Biochemical Engineering Journal*, **31**: 141-147.

# Annexes

**Annexe 1:**

**Figure 13. Spectre d'absorbance du 2,4-dichlorophénol (Concentration = 5µg/ml)**

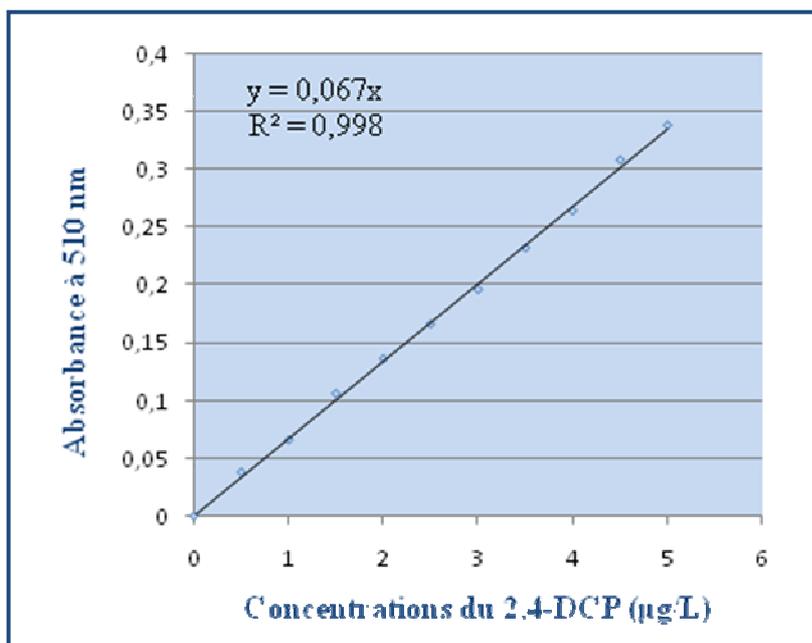
Longueurs d'ondes (nm)	Absorbance
440	0,201
460	0,221
500	0,330
505	0,335
510	0,340
515	0,323
520	0,289
540	0,242
560	0,186
600	0,134



**Annexe 2:**

**Figure 14. Courbe étalon du 2,4-dichlorophénol**

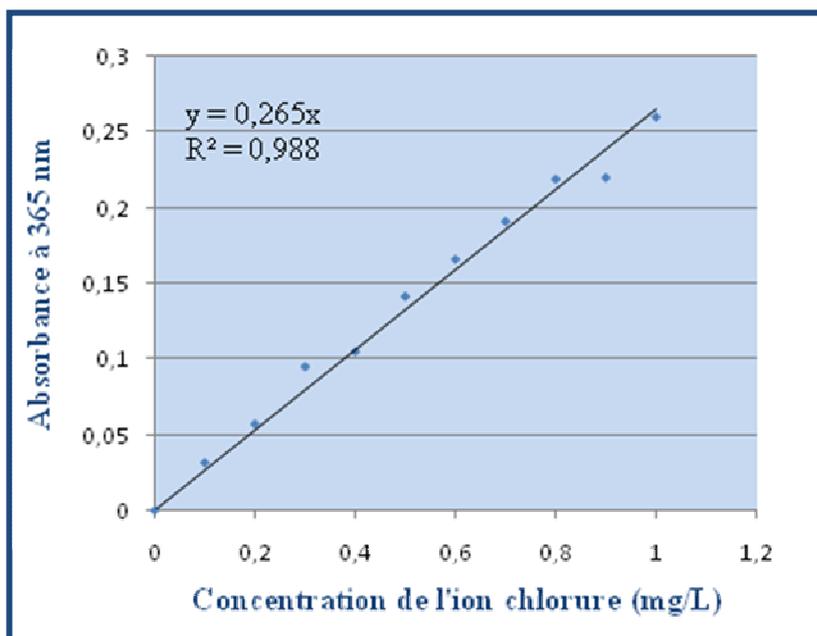
Concentrations du 2,4-DCP ( $\mu\text{g/L}$ )	Absorbance
0	0,000
0,5	0,038
1	0,066
1,5	0,106
2	0,136
2,5	0,166
3	0,196
3,5	0,232
4	0,264
4,5	0,308
5	0,338



**Annexe 3:**

**Figure 15. Courbe étalon de l'ion chlorure**

Concentrations de l'ion chlorure (mg/L)	Absorbance
0	0,0000
0,1	0,0315
0,2	0,0570
0,3	0,0950
0,4	0,1050
0,5	0,1415
0,6	0,1660
0,7	0,1910
0,8	0,2190
0,9	0,2200
1	0,2600



## Annexe 4 :

**Tableau 3. Cinétique de la dégradation du 2,4-dichlorophénol (concentrations et pH) (mg/L)**

Temps Témoin et dilutions	0h	2h	6h	8h	18h	24h	48h	72h	7j	14j	30j	56j
<b>Témoin stérile</b>	202,68 6,82	203,42 6,80	201,94 6,81	200,94 6,82	189,27 6,81	187,77 6,80	183,77 6,84	180,02 6,81	177,34 6,81	150,52 6,81	137,11 6,83	121,70 6,79
<b>Inoculum non dilué</b>	212,11 6,84	212,12 6,83	212,36 6,90	212,15 6,92	197,21 6,89	192,88 6,75	173,54 6,76	144,87 6,79	133,88 6,79	128,05 6,79	100,66 6,79	102,19 6,74
<b>Dilution 10<sup>-1</sup></b>	211,13 6,82	211,24 6,80	211,36 6,84	211,74 6,84	192,24 6,82	191,26 6,78	165,72 6,73	146,77 6,72	137,11 6,77	125,67 6,77	102,59 6,78	106,06 6,73
<b>Dilution 10<sup>-2</sup></b>	207,15 6,81	207,89 6,80	207,39 6,82	206,20 6,86	191,25 6,80	185,79 6,76	160,55 6,78	144,86 6,79	130,65 6,77	100,97 6,76	98,94 6,74	101,32 6,75
<b>Dilution 10<sup>-3</sup></b>	204,91 6,80	204,17 6,80	204,54 6,82	205,68 6,87	190,25 6,80	187,28 6,76	161,49 6,78	136,25 6,76	129,97 6,77	112,56 6,76	92,74 6,77	100,97 6,76
<b>Dilution 10<sup>-4</sup></b>	206,40 6,81	207,15 6,80	206,03 6,85	206,19 6,87	184,29 6,85	181,46 6,73	157,57 6,70	140,76 6,77	125,63 6,75	102,62 6,77	101,9 6,77	106,48 6,75
<b>Dilution 10<sup>-5</sup></b>	205,66 6,80	205,16 6,80	205,65 6,85	205,60 6,91	180,32 6,90	178,09 6,72	152,93 6,72	133,94 6,72	121,96 6,76	103,32 6,78	99,34 6,76	98,69 6,73
<b>Dilution 10<sup>-6</sup></b>	204,17 6,80	204,17 6,80	204,53 6,85	204,95 6,88	177,34 6,87	166,92 6,78	151,71 6,73	135,58 6,73	111,82 6,78	96,12 6,76	96,00 6,75	96,33 6,73
<b>Dilution 10<sup>-7</sup></b>	204,17 6,80	204,54 6,80	204,16 6,83	204,21 6,86	186,28 6,83	180,87 6,74	167,95 6,70	156,42 6,72	123,40 6,73	101,82 6,74	97,60 6,74	96,94 6,75
<b>Dilution 10<sup>-8</sup></b>	203,18 6,80	203,66 6,80	204,51 6,84	205,20 6,90	176,68 6,80	172,88 6,71	161,12 6,72	137,29 6,70	119,13 6,75	102,56 6,74	94,88 6,78	97,52 6,73
<b>Dilution 10<sup>-9</sup></b>	203,67 6,80	206,42 6,80	203,64 6,81	203,72 6,87	180,33 6,88	171,39 6,70	154,17 6,72	137,91 6,72	117,74 6,74	100,08 6,73	94,33 6,74	97,52 6,74

## Annexe 5

**Tableau 4. Pourcentages de la dégradation du 2,4-dichlorophénol**

Temps T et dil	0-2h	6h	8h	18h	24h	48h	72h	7j	14j	30j	56j
<b>Témoin stérile</b>	0	0,370	0,85	6,61	7,36	9,70	11,18	12,5	25,73	32,35	40
<b>Inoculum non dilué</b>	0	0	0	7,02	9,06	18,18	31,70	36,88	39,63	52,54	51,82
<b>Dilution 10<sup>-1</sup></b>	0	0	0	8,94	9,41	21,50	30,48	35,05	40,47	51,40	49,76
<b>Dilution 10<sup>-2</sup></b>	0	0	0	7,67	10,31	22,50	30,06	36,92	51,25	52,23	51,08
<b>Dilution 10<sup>-3</sup></b>	0	0	0	7,15	8,60	21,18	33,50	36,04	45,06	54,74	50,72
<b>Dilution 10<sup>-4</sup></b>	0	0	0	10,71	12,08	23,65	31,80	39,13	50,28	49,37	48,41
<b>Dilution 10<sup>-5</sup></b>	0	0	0	12,32	13,40	25,62	34,87	40,70	49,76	51,69	52,01
<b>Dilution 10<sup>-6</sup></b>	0	0	0	13,14	18,24	25,69	33,59	45,23	52,92	47,01	52,82
<b>Dilution 10<sup>-7</sup></b>	0	0	0	8,76	11,41	17,74	23,38	39,56	50,13	52,19	52,51
<b>Dilution 10<sup>-8</sup></b>	0	0	0	13,04	14,91	20,70	32,43	41,36	49,52	53,30	52,00
<b>Dilution 10<sup>-9</sup></b>	0	0	0	11,46	15,85	24,30	32,28	42,19	50,86	53,68	52,12

## Annexe 6

**Tableau 5. Cinétique de la libération de l'ion chlorure (mg/L)**

Temps Témoin et dilutions	0h	2h	6h	8h	18h	24h	48h	72h	7j	14j	30j	56j
<b>Inoculum non dilué</b>	0,212	0,121	0,210	0,212	0,220	0,220	0,225	0,229	0,234	0,238	0,236	0,237
<b>Dilution 10<sup>-1</sup></b>	0,194	0,195	0,193	0,195	0,198	0,198	0,201	0,203	0,205	0,208	0,209	0,210
<b>Dilution 10<sup>-2</sup></b>	0,188	0,188	0,187	0,188	0,189	0,190	0,192	0,195	0,199	0,201	0,201	0,202
<b>Dilution 10<sup>-3</sup></b>	0,160	0,159	0,160	0,161	0,162	0,164	0,167	0,169	0,172	0,175	0,176	0,177
<b>Dilution 10<sup>-4</sup></b>	0,177	0,176	0,177	0,177	0,178	0,179	0,179	0,181	0,193	0,193	0,194	0,194
<b>Dilution 10<sup>-5</sup></b>	0,181	0,181	0,181	0,182	0,183	0,184	0,185	0,187	0,190	0,192	0,192	0,193
<b>Dilution 10<sup>-6</sup></b>	0,169	0,170	0,170	0,170	0,172	0,173	0,174	0,175	0,179	0,181	0,182	0,182
<b>Dilution 10<sup>-7</sup></b>	0,168	0,169	0,169	0,168	0,170	0,171	0,175	0,177	0,178	0,181	0,183	0,182
<b>Dilution 10<sup>-8</sup></b>	0,179	0,178	0,177	0,177	0,180	0,181	0,182	0,185	0,190	0,192	0,192	0,193
<b>Dilution 10<sup>-9</sup></b>	0,181	0,182	0,182	0,181	0,183	0,186	0,189	0,190	0,195	0,194	0,196	0,195

## Annexe 7

**Tableau 6. ANOVA pour tester l'effet de la dilution sur la biodégradation**

Source	ddl	SC	CM	F	p
<b>Facteur dilution</b>	9	5440	604	<b>0,31</b>	<b>0,971</b>
<b>Erreur</b>	350	680015	1943		
<b>Total</b>	359	685456			

## Annexe 8:

**Tableau 7. Test de student pour comparer la dégradation biotique et abiotique**

Source	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	T	p
<b>Dilutions</b>	360	159,8	2,3	<b>-3,69</b>	<b>0,001</b>
<b>Témoin stérile</b>	36	178,2	4,4		

## Résumé

La capacité du microbiote total du sol à dégrader le 2,4-dichlorophénol est testée dans un milieu de croissance minimum où il est la seule source de carbone et d'énergie, à une concentration initiale de 200mg/L. Les cultures sont effectuées dans des fermenteurs miniaturisés, menées en batch et incubées à 30°C sans agitation pendant 56 jours. Le suivi de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol est effectué par un dosage de la concentration, la mesure du pH du milieu et le dosage de l'ion chlorure à différents intervalles de temps. La concentration du 2,4-dichlorophénol est mesurée au spectrophotomètre par la méthode de 4-AAP et l'ion chlorure par turbidimétrie à 365 nm. Un isolement de groupements microbiens dominants est effectué par la méthode de la dilution-extinction, suivie d'une identification.

La cinétique de biodégradation de 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique engendre une phase de latence de 8 heures. Au-delà, démarre la dégradation du substrat, elle est relativement rapide durant les premières 72 heures où on note une perte moyenne de 30% pour l'ensemble des dilutions. Après cette période, la concentration du 2,4-dichlorophénol continue à diminuer avec une faible vitesse de dégradation. Elle décroît progressivement jusqu'à devenir nulle. Au bout de 56 jours, le 2,4-dichlorophénol est dégradé à hauteur de 52 % au maximum, pour l'ensemble des dilutions, sans production de gaz et avec une libération non stoechiométrique d'ion chlorure. Cette situation, laisse supposer que le 2,4-dichlorophénol n'est pas minéralisé et pourrait être transformé en sous produits dérivés, en voie d'identification. La différence de biodégradation entre les différentes dilutions est non significative ( $p > 0,05$ ). Par ailleurs, le 2,4-DCP est aussi dégradé par voie abiotique (témoin stérile) où 40% de sa concentration initiale sont éliminés au bout de 56 jours. La différence entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est très significative ( $p < 0,05$ ). La recherche de groupements microbiens dominants impliqués dans ce phénomène a révélé la présence de trois genres bactériens: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. et probablement *Acinetobacter* sp. avec un genre fongique identifié comme *Aspergillus* sp.

**Mots clés** : Biodégradation, 2,4-dichlorophénol, microbiote total du sol.

## Abstract

The capacity of soil microflora to degrade 2,4-dichlorophenol is tested in a minimum medium of growth which the substrate is the sole source of carbon and energy, with an initial concentration of 200 mg/L. The cultures are carried out in miniaturized fermentors, incubated at 30°C in batch without agitation during 56 days. The follow-up of the biodegradation of the 2,4-dichlorophenol is carried out by the measure of the concentration, the measure of the medium pH and the proportioning of the chloride release at various time intervals. The concentration of the 2,4-dichlorophenol is measured spectrophotometrically by the method of 4-AAP and chloride by turbidimetry at 365 nm. An isolation of dominant microbial groups is carried out by the method of the dilution-extinction, followed by identification.

Kinetic biodegradation of 2,4-dichlorophenol by the telluric microflora reveals a lag phase of 8 hours. Beyond, the degradation of the substrate starts, it is relatively fast during the first 72 hours witch we note an average loss of 30% for the whole of dilutions. After this period, the concentration of 2,4-dichlorophenol continues to decline with a low rate of degradation. It gradually decreases until it becomes zero. After 56 days, 2,4-dichlorophenol is degraded up to 52% maximum, for all the dilutions, without gas production and with a non-stoichiometric release of chloride. This situation suggests that 2,4-dichlorophenol is not mineralized and could be transformed into by-products, whose analysis is in hand. The difference of biodegradation between the differents dilutions is insignificant ( $p > 0.05$ ). In addition, 2,4-DCP is also degraded by abiotic process where 40% of its initial concentration are lost after 56 days. The difference between the two processes of degradation, biotic and abiotic, is very significant ( $p < 0.05$ ). The search for microbial dominant groups involved in this phenomenon revealed the presence of three bacterial types: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, probably *Acinetobacter* and with a fungus.gendre identified as *Aspergillus*.

**Key words:** Biodegradation, 2,4-dichlorophenol, soil microflora.

## ملخص

تم اختبار قدرة ميكروبات التربة على تفكيك 4،2 ثنائي كلور الفينول في وسط بدائي من حيث هو المصدر الوحيد للكربون والطاقة بتركيز 200 ملغ / ل. عملية الزرع تمت في مخمرات مصغرة، أجريت بطريقة غير مستمرة وحضنت في 30°م بدون رج. متابعة الهدم الحيوي ل4،2 ثنائي كلور الفينول تم بواسطة قياس تركيزه، درجة حموضة الوسط و تحديد أيون الكلوريد في فترات زمنية مختلفة. تركيز 4،2 ثنائي كلور الفينول تم قياسه بواسطة طريقة 4-AAP و أيون الكلوريد بقياس الكثافة الضوئية في 365 نانومتر. تم عزل المجموعات الميكروبية المهيمنة في تفكيك 4،2 ثنائي كلور الفينول يليها التعرف على هويتها.

تظهر حركية الهدم الحيوي ل 4،2 ثنائي كلور الفينول فترة كمون مقدرة ب 8 ساعات. بعدها تبدأ عملية الهدم، سريعة نسبيا خلال 72 ساعة الأولى أين كانت نسبة الهدم في متوسط 30 % بالنسبة لجميع التخفيفات. وبعد هذه الفترة ، تركيز 4،2 ثنائي كلور الفينول يستمر في الإنخفاض تدريجيا لكن بسرعة ضعيفة، إلى أن يصبح منعدم. بعد 56 يوم ، نسبة الهدم الحيوي ل4،2 ثنائي كلور الفينول وصلت إلى 52 % كحد أقصى لجميع التخفيفات ، ودون إنتاج الغاز مع تحرير غير كامل للأيون الكلوريد. هذه الحالة تشير إلى أن 2،4 ثنائي كلور الفينول لم يتحول إلى معدن واحتمال تحوله إلى نواتج ثانوية التي يجري تحديدها. الفرق بين الهدم الحيوي بين مختلف التخفيفات ليست كبيرة ( $p>0,05$ ). وبالإضافة إلى ذلك لوحظت عملية هدم غير حيوي ل4،2 ثنائي كلور الفينول حيث تم إزالة 40 % من التركيز الأولي بعد 56 يوما. الفرق بين عمليتي الهدم، حيوي و لحيوي ، شاسع جدا ( $p<0,05$ ). اظهر البحث عن المجموعات الميكروبية المهيمنة التي تدخلت في هذه الظاهرة وجود ثلاثة أنواع من البكتيريا : *Alcaligenes sp.* *Pseudomonas sp.* وربما *Acinetobacter sp.* مع فطر تم تحديد نوعه ب *Aspergillus sp.*

**كلمات مفتاحية:** الهدم الحيوي، 4،2 ثنائي كلور الفينول، ميكروبات التربة .

**Nom:** NOUMEUR

Date de soutenance:.....

**Prénom:** SARA RAOUIA

**Titre:** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna)

### Résumé

La capacité du microbiote total du sol à dégrader le 2,4-dichlorophénol est testée dans un milieu de croissance minimum où il est la seule source de carbone et d'énergie, à une concentration initiale de 200mg/L. les cultures sont effectuées dans des fermenteurs miniaturisés, menées en batch et incubées à 30°C sans agitation pendant 56 jours. Le suivi de la biodégradation du 2,4-dichlorophénol est effectué par un dosage de la concentration, la mesure du pH du milieu et le dosage de l'ion chlorure à différents intervalles de temps. La concentration du 2,4-dichlorophénol est mesurée au spectrophotomètre par la méthode de 4-AAP et l'ion chlorure par turbidimétrie à 365 nm. Un isolement de groupements microbiens dominants est effectué par la méthode de la dilution-extinction, suivie d'une identification.

La cinétique de biodégradation de 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique engendre une phase de latence de 8 heures. Au-delà, démarre la dégradation du substrat, elle est relativement rapide durant les premières 72 heures où on note une perte moyenne de 30% pour l'ensemble des dilutions. Après cette période, la concentration du 2,4-dichlorophénol continue à diminuer avec une faible vitesse de dégradation. Elle décroît progressivement jusqu'à devenir nulle. Au bout de 56 jours, le 2,4-dichlorophénol est dégradé à hauteur de 52 % au maximum, pour l'ensemble des dilutions, sans production de gaz et avec une libération non stœchiométrique d'ion chlorure. Cette situation, laisse supposer que le 2,4-dichlorophénol n'est pas minéralisé et pourrait être transformé en sous produits dérivés, en voie d'identification. La différence de biodégradation entre les différentes dilutions est non significative ( $p > 0,05$ ). Par ailleurs, le 2,4-DCP est aussi dégradé par voie abiotique (témoin stérile) où 40% de sa concentration initiale sont éliminés au bout de 56 jours. La différence entre les deux processus de dégradation, biotique et abiotique, est très significative ( $p < 0,05$ ). La recherche de groupements microbiens dominants impliqués dans ce phénomène a révélé la présence de trois genres bactériens: *Pseudomonas* sp., *Alcaligenes* sp. et probablement *Acinetobacter* sp. avec un genre fongique identifié comme *Aspergillus* sp.

**Mots clés:** Biodégradation, 2,4-dichlorophénol, Microbiote total du sol.

**Laboratoire de recherche:** Laboratoire de Génie Microbiologique et applications

**Directeur de recherche:** Pr. BOUSSEBOUA HACÈNE

### Membres de Jury:

MERAIHI Z.

BOUSSEBOUA H.

DJEBBAR K.

BOULAHROUF A.

HAMIDECHI A.

**Président:**

**Rapporteur:**

**Examineur:**

**Examineur:**

**Examineur:**

Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.

Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.

Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. Chimie.

Prof. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.

M.C. Univ. Mentouri de Constantine. Fac. SNV.