

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOULOU D MAMMERI DE TIZI-OUZOU



FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES
AGRONOMIQUES

DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE - MICROBIOLOGIE

Mémoire

De fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Contribution à l'étude de la dégradation de
polluants par certaines souches bactériennes

Présenté par

ACHAB Katia

BOUKAIS Lyticia

Devant le jury d'examen composé de :

Présidente : M^{me} BEN AHMED DJILALI A.

Promotrice : M^{me} HELLAL Z.

Co-Promotrice : M^{me} MESBAHI N.

Examinatrice : M^{me} ASMANI K.

Examineur : M^r MEDJKOUN N.

Maitre de conférences A à l'UMMTO

Maitre assistante A à l'UMMTO

Maitre assistante à l'UMMTO

Maitre de conférences B à l'UMMTO

Maître assistant A à l'UMMTO

Année universitaire : 2015 - 2016

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier en premier lieu le Bon Dieu de nous avoir donné la force, la volonté et le courage pour terminer ce modeste travail.

Nous remercions très sincèrement :

Notre promotrice Mme HELLAL Z. pour ses orientations et ses conseils.

Notre Co-Promotrice Mme MESBAHI N. de nous avoir guidé tout au long de ce travail et pour sa disponibilité.

Mme BEN AHMED DJILLALI A. de nous avoir fait l'honneur d'être la présidente du jury

Mme ASMANI K. pour avoir accepté de faire partie des membres du jury et d'évaluer notre travail.

Monsieur MEDJKOUN N. pour avoir accepté d'examiner notre travail ainsi que sa disponibilité à répondre à nos questions.

Les ingénieurs du laboratoire pédagogique de Microbiologie, laboratoire commun de physico-chimie I et II, pour nous avoir permis d'effectuer nos analyses ainsi que pour leur gentillesse tout au long de notre pratique.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À mes très chers parents auxquels je dois tout.

À ma sœur Zenza

À mes deux frères Jugurtha et Juba

À tous mes amis, pour leurs encouragements, leur soutien et leur motivation.

Katia

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents et à ma famille qui m'ont soutenu tout au long de ce travail

À la mémoire de mon frère Fanis que Dieu l'accueille dans son vaste paradis

À ma sœur Tihā, ma cousine Mimine et à mes tantes

À tous mes amis surtout Salim, Kouceila, Malika, Khelifa, Dehbia, Lila et Racine pour leur soutien et pour la bonne ambiance.

Lætitia

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Index des tableaux

Index des figures

Résumé

Abstract

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : La pollution du sol

1. Le sol.....	1
2. La pollution du sol	3
3. Les polluants du sol	3
3.1. Définition	3
3.2. Types de polluants	3
3.2.1. Les polluants organiques	4
3.2.1.1. Les hydrocarbures	4
3.2.1.2. Les produits organiques industriels.....	4
3.2.2. Les polluants inorganiques	4
3.3. Comportement des polluants dans les sols.....	5
4. La dépollution des sols	6
4.1. Définition	6
4.2. Les différentes techniques de dépollution.....	6
4.2.1. Classement en fonction de la nature des procédés employés.....	6
4.2.1.1. Les procédés physiques.....	6
4.2.1.2. Les procédés chimiques	6
4.2.1.3. Les procédés thermiques	6
4.2.1.4. Les procédés biologiques	6
4.2.1.4.1. La bioaugmentation	7
4.2.1.4.2. La biostimulation	7
4.2.1.4.3. Le compostage	8
4.2.1.4.4. La phytoremédiation	8

Chapitre 2: Les phtalates

1.	Définition du groupe des phtalates	9
2.	Caractères physico-chimiques	10
3.	Applications industrielles	12
4.	Sources et voies d'exposition aux phtalates.....	13
5.	Effet des phtalates sur l'homme et l'environnement	15
5.1.	Effets des phtalates sur la santé humaine.....	15
5.1.1.	Toxicité	15
5.1.2.	Effets atypiques.....	15
5.1.3.	Effets cancérogènes	15
5.1.4.	Effets tératogènes.....	16
5.1.5.	Effets perturbateurs endocriniens	16
5.2.	Effets des phtalates sur l'environnement	17
6.	Processus de dégradation	18
6.1.	Dégradation abiotique.....	18
6.1.1.	L'hydrolyse.....	18
6.1.2.	La photolyse.....	18
6.2.	Biodégradation.....	19
6.2.1.	Micro-organismes	19
6.2.2.	Eucaryotes.....	22

Chapitre 3 : Le chrome

1.	Généralités	23
1.1.	Caractéristiques du chrome.....	23
1.2.	Utilisations	25
2.	Sources du chrome et comportement dans l'environnement	25
3.	Toxicité du Chrome	26
3.1.	Effet toxique	26
3.2.	Pouvoir cancérigène.....	26
3.3.	Effets sur la reproduction et le développement.....	27
4.	Moyens de remédiation.....	27
4.1.	Méthodes physico-chimiques	27
4.1.1.	Lavage du sol	27
4.1.2.	Extraction thermique.....	28

4.1.3. Electromigration	28
4.2. Techniques de Bio-remédiation	29
4.2.1. Bio-réduction par les bactéries et les champignons	29
4.2.2. La phytoremédiation	32

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

1. Matériel	33
1.1. Produits chimiques et milieux de culture	33
1.2. Appareillage	34
1.3. Matériel biologique	34
1.3.1. Le sol	34
1.3.2. Les souches bactériennes utilisées	34
2. Méthodes	35
2.1. Caractérisation du sol	35
2.1.1. Analyse physico-chimique du sol	35
2.1.1.1. Analyse granulométrique	35
2.1.1.2. L'humidité du sol	36
2.1.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)	37
2.1.1.4. Conductivité électrique	37
2.1.1.5. Évaluation de taux de carbone organique	37
2.1.1.6. Évaluation du taux de la matière organique	38
2.1.2. Dénombrement de la microflore du sol	38
2.2. Vérification de la pureté des souches	39
2.2.1. Aspect macroscopique	40
2.2.2. Aspect microscopique	40
2.2.2.1. Coloration de Gram	40
2.2.2.1.1. Préparation de l'échantillon	40
2.2.2.1.2. Coloration du frottis	40
2.2.2.2. Recherche de spores	41
2.2.3. Tests biochimiques	41
2.2.3.1. Recherche de la catalase	41
2.2.3.2. Recherche de l'oxydase	42
2.2.3.3. Recherche de la coagulase	42

2.3. Conservation des souches purifiées	43
2.4. Méthodologie de bioremédiation	43
2.4.1. Préparation des échantillons du sol	44
2.4.1.1. Sol pollué non stérile (SNS).....	44
2.4.1.2. Sol pollué stérile (Sol st).....	45
2.4.1.3. Sol témoin	45
2.4.2. Adaptation des souches à la pollution.....	45
2.4.2.1. Préparation de l'inoculum	46
2.4.2.2. Sol bioaugmenté.....	46
2.4.3. Dosage des polluants	48
2.4.3.1. Extraction et analyse du DnOP	48
2.4.3.2. Dosage du chrome.....	50
2.4.4. L'activité enzymatique	50
Résultats et discussions	
1. Caractéristiques du sol	51
1.1. Caractéristiques physico-chimiques du sol.....	51
1.1.1. Granulométrie	51
1.1.2. Humidité	52
1.1.3. Conductivité électrique et pH du sol.....	52
1.1.4. Éléments carbonés	52
1.2. Analyses microbiologiques du sol	52
1.2.1. Dénombrement de la microflore bactérienne.....	52
1.3. Vérification de la pureté des souches bactériennes utilisées	53
2. Tests de biodégradation	55
2.1. Étude de la biodégradation dans le sol (microcosme)	55
2.1.1. Analyse de l'évolution du pH	55
2.1.1.1. Effet du pH sur la flore indigène du sol.	55
2.1.1.2. Évolution du pH sur les échantillons de sol pollué par le DnOP.....	56
2.1.1.3. Évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par le DnOP et le Cr VI.....	57
2.1.2. Analyse du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI	58
2.1.2.1. Analyse du taux de dégradation du DnOP et de réduction du CrVI dans un sol pollué non inoculé.....	58
2.1.2.2.1. Selon le type de l'inoculum.....	60

2.1.2.2.1.1. DnOP	60
2.1.2.2.1.2. Cr VI.....	63
2.1.2.2.2. .Effet de la présence du Cr VI sur la dégradation du DnOP	64
2.1.3. Analyse de l'activité enzymatique	66
2.1.3.1.Effet des polluants sur l'activité de la catalase des souches présentes dans les échantillons sol.....	66

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation

ATCC : American Type Culture Collection

Atm. : Atmosphère

BBP : Butyle benzyle phtalate

BHIB : Brain Heart Infusion Broth (bouillon cœur cerveau)

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène

CAS : Chemical Abstract Services

COV : Hydrocarbures halogénés volatils

Cr (VI) : Chrome hexavalent

Cr (III) : Chrome trivalent

DEHP : Di (2 éthylhexyle) phtalate

DEP : Di-éthyle phtalate

DMP : Di-méthyle phtalate

DnBP : Di-n-butyle phtalate

DnOP: Di-n-octyle phtalate

DO : Densité optique

EDTA : Acide éthylène-diamino-tétraacétique

EMP : Ethyl-methyl phtalates

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

INERIS : Institut National de Recherche et de Sécurité

ISO : International Standards Organization

Koc : Coefficient de partage

MMP : Monomethyl phtalates

MSM : Mineral Salts Medium

NAF : Nomenclature d'activités française

NF : Norme Française

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Phtalic Acid (acide phtalique)

PCB : Polychlorobiphényle

pH : Potentiel d'hydrogène

SNS : Sol non sterile

Sol st : Sol Pollué Stérile

USDHHS : US Department of Health and Human Security

Index des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
Tableau I	Les différents constituants du sol	1
Tableau II	Nomenclature et structure des six phtalates	10
Tableau III	Caractéristiques physiques de quelques phtalates	11
Tableau IV	Description des principaux phtalates pour usage commercial et industriel	12
Tableau V	Demi-vies lors des phénomènes de dégradation abiotique	19
Tableau VI	caractères physico-chimiques du chrome	23
Tableau VII	Chrome et ses dérivés	24
Tableau VIII	les avantages et inconvénients des techniques physico-chimiques	28
Tableau IX	Réduction du Cr (VI) par différentes bactéries	31
Tableau X	Produits chimiques et milieux de culture utilisés	33
Tableau XI	Caractéristiques du sol étudié	51
Tableau XII	Caractères morphologiques et biochimiques des souches utilisées	53

Index des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	La composition moyenne des différentes fractions du sol	2
Figure 2	Représentation schématique des processus influençant le devenir des polluants dans les sols	5
Figure 3	(a) L'acide phtalique, (b) la formule des esters de l'acide phtalique	9
Figure 4	Formules développées de quelques phtalates	9
Figure 5	Sources et voies d'exposition aux phtalates pour l'Homme	14
Figure 6	Les voies de dégradation du Di éthyle phtalates	20
Figure 7	Biodégradation de l'acide phtalique dans l'environnement	21
Figure 8	Processus de dégradation du DEHP	22
Figure 9.	Les différents types de phytoremédiation.	32
Figure 10	Schéma représentatif de la classification des fractions de sol selon ATTERBERG	36
Figure 11	Schéma de la méthode de dénombrement de la flore totale du sol	39
Figure 12	Procédé d'adaptation des souches bactériennes sur milieu liquide pollué	46
Figure 13	Procédé de bioremédiation du sol pollué par le DnOP et le chrome	47
Figure 14	Protocole d'extraction du DnOP	49
Figure 15	Aspect microscopiques des souches bactériennes observé au microscope optique (GX1000)	54

Figure 16	Effet de l'évolution du pH sur la flore indigène dans les échantillons de sol pollué	55
Figure 17	Évolution du pH des échantillons de sol pollué par le DnOP	56
Figure 18	Évolution du pH des échantillons de sol pollué par le DnOP et le Cr VI	57
Figure 19	Évolution du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI dans le sol pollué stérile et non stérile.	58
Figure 20	Taux de dégradation Du DnOP selon le type de l'inoculum	60
Figure 21	Interaction entre <i>Bacillus cereus</i> ATCC10876 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300 par piqure sur gélose LB	62
Figure 22	Taux de réduction du Cr VI selon le type de l'inoculum.	63
Figure 23	Effet de la présence du Cr VI sur le taux de dégradation Du DnOP dans les échantillons de sol.	64
Figure 24	Évolution de l'activité enzymatique (catalase) en fonction du temps d'incubation du sol pollué non stérile	66

Résumé

Les phtalates et le chrome font partie des substances toxiques persistantes par leur utilisation de plus en plus importante, ces composés sont présents dans tous les compartiments de l'environnement où ils sont rejetés par les activités humaines.

Leur toxicité se traduit par des effets cancérogènes, tératogènes et des perturbations endocriniennes. Leur usage étant largement répandu, il est nécessaire de parvenir à une meilleure connaissance de leurs mécanismes de diffusion et de leur devenir dans notre environnement.

L'objectif de notre travail était en premier lieu, l'adaptation de nos souches bactériennes aux polluants, puis tester leur capacité de dégradation dans un sol pollué artificiellement.

Nous avons procédé à une extraction des phtalates (DnOP) à l'aide du dichlorométhane, puis à sa pesée. Le dosage du Cr VI a été réalisé par le 1,5-diphénylcarbazide.

Différents paramètres comme le pH, le type de l'inoculum et la présence de la flore indigène, ainsi que le Cr VI, ont été étudiés afin de déterminer leur impact sur le taux de dégradation du DnOP et le taux de réduction du Cr VI. Enfin, nous avons effectué un suivi de l'activité enzymatique dans les échantillons de sol afin de connaître l'effet de ces polluants sur l'activité microbienne.

Les résultats obtenus montrent que *S.aureus* ATCC43300 présente un meilleur taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI. Nous avons constaté que la flore indigène présente un impact sur la dégradation du DnOP et sur la réduction du Cr VI.

Concernant l'activité enzymatique (catalase), notre étude montre que le DnOP, n'avait pas d'influence considérable sur l'activité microbienne pendant la période d'incubation des échantillons.

Mots clés : DnOP, Cr VI, activité enzymatique, flore indigène, *S.aureus* ATCC43300, pH.

Abstract

Phthalates and chromium are a persistent toxic substances which the use is more and more important, these compounds are present in all compartments of the environment where they are rejected by human activities.

Their toxicity results in carcinogenic, teratogenic and endocrine disruption. Since their use is widespread, it is necessary to reach a better understanding of their spread mechanisms and fate in the environment.

The aim of our work was first, the adaptation of our bacterial strains to pollutants and test their ability of degradation in an artificially contaminated soil.

We performed an extraction of phthalates (DnOP) using dichloromethane and then to its weighing. In terms of the chromium (Cr VI), an assay using 1,5-diphénylcarbazine was carried out.

Various parameters such as pH, type of inoculum and the presence of indigenous flora, as well as Cr VI, were studied to determine their impact on the DnOP degradation rate and the reduction rate of Cr VI. Finally, we followed up on the enzyme activity in the soil samples in order to know the effect that can have these pollutants on microbial activity.

The results show that *S. aureus* ATCC43300 performed a higher rate of degradation of DnOP and reduction of Cr VI. We also found that the indigenous flora has an impact on the degradation of DnOP and reduction of Cr VI.

Concerning the enzyme activity (catalase), our study shows that DnOP, had no significant influence on microbial activity during the samples incubation period.

Keywords : DnOP, Cr VI, enzyme activity, indigenous flora, *S. aureus* ATCC43300, pH.



Introduction

La pollution des sols est due aux activités agricole, industrielle et urbaine devenant aujourd'hui un problème préoccupant. En effet, cela se traduit par des impacts négatifs sur les activités dépendant directement ou indirectement de la terre, mais aussi sur la santé humaine et les écosystèmes. Parmi les polluants du sol connus : les phtalates et le chrome.

Les phtalates sont des molécules organiques synthétisées volontairement pour leurs propriétés plastifiantes. Ils sont utilisés comme plastifiants dans l'industrie des matières plastiques (chlorure de polyvinyle -PVC) depuis 1930.

Leur présence est largement signalée dans l'environnement. Leur dispersion se produit lors de la fabrication, transport et utilisation dans les industries de transformation ou lors de la dégradation des produits finis.

L'exposition, souvent difficile à évaluer, peut se produire par inhalation, contact ou ingestion. Les phtalates figurent actuellement sur la liste des 33 substances dangereuses prioritaires de la Commission Européenne (2000/60/CE) puisqu'ils sont suspectés d'effets toxiques et cancérogènes.

Le chrome est l'un des métaux les plus largement utilisés dans l'industrie, notamment dans l'industrie des aciers inoxydables, dans la tannerie, pour le traitement du bois...etc. Des quantités importantes de chrome ont été rejetées dans l'environnement suite à de la négligence ou à des accidents.

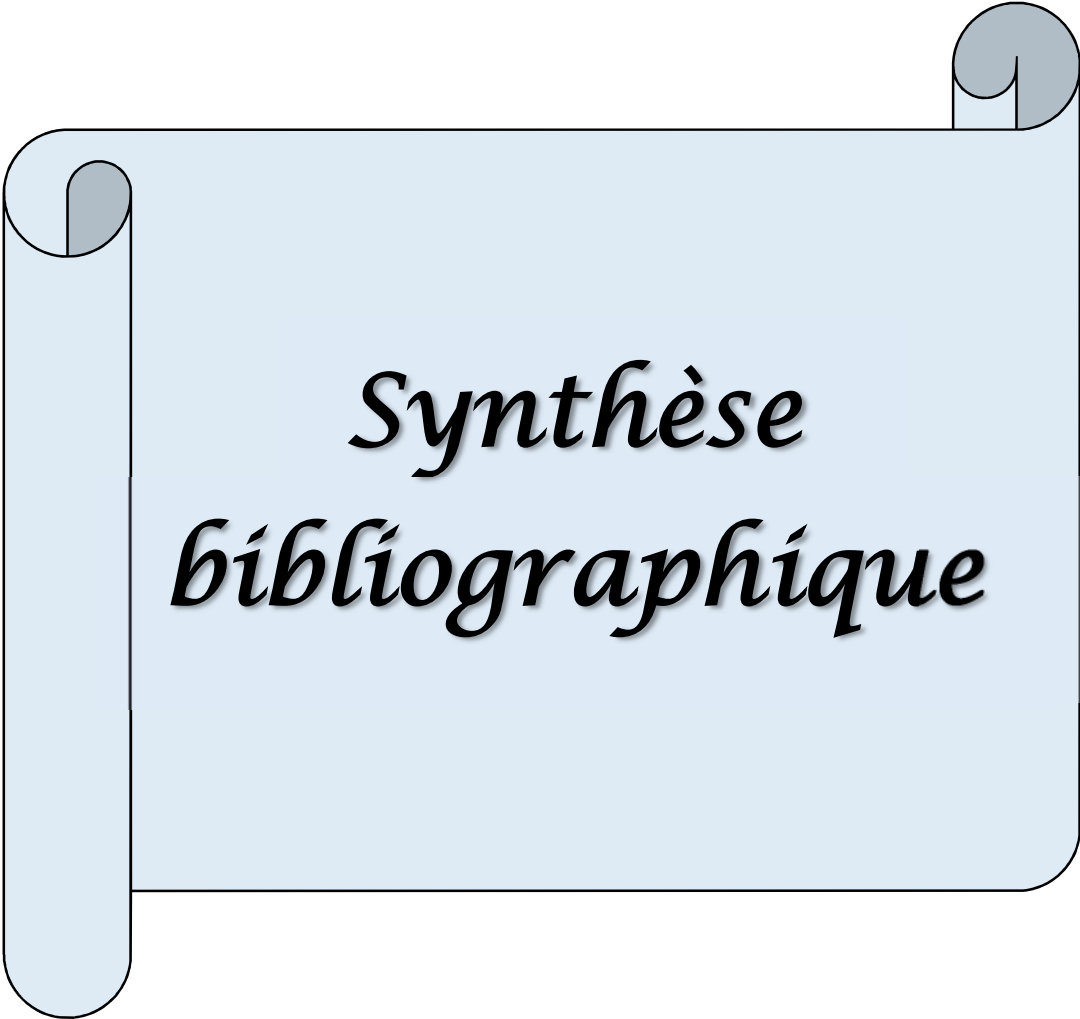
C'est la forme dite hexavalente (Cr VI) qui est la plus problématique car sous cette forme, le chrome est très toxique pour la santé humaine mais aussi très soluble dans l'eau. Cette solubilité lui confère une grande mobilité dans les écosystèmes. Les méthodes mises en œuvre aujourd'hui pour traiter les sols pollués font appel à des bactéries capable de dégrader les polluant en substances non dangereuses on parle de bioremédiation de sol.

L'objectif de notre travail consiste à tester la capacité de certaines souches bactériennes à dégrader les phtalates (DnOP) et à réduire le chrome dans un sol pollué artificiellement.

Ce présent mémoire comporte deux parties, la première partie sera dédiée à la recherche bibliographique où des notions sur la pollution du sol ainsi que des données sur les phtalates et le chrome qui font l'objet de notre expérimentation.

La deuxième partie est divisée en deux chapitres, le premier chapitre porte sur la description du matériel et les méthodes utilisées pour étudier l'impact de différents paramètres (pH, type d'inoculum, présence de flore indigène....etc.) sur le taux de dégradation du DnOP et la réduction du Cr VI suite à des essais de bioremediation de sol pollué.

Le second chapitre illustrera les résultats obtenus de différentes expériences réalisées ainsi qu'une discussion suivie d'une conclusion générale.



*Synthèse
bibliographique*



Chapitre I
La pollution du sol

1. Le sol

Par définition, le sol est la couche supérieure de la croûte terrestre composée de particules minérales, de matières organiques, d'eau, d'air et d'organismes (GOBAT *et al.*, 2003).

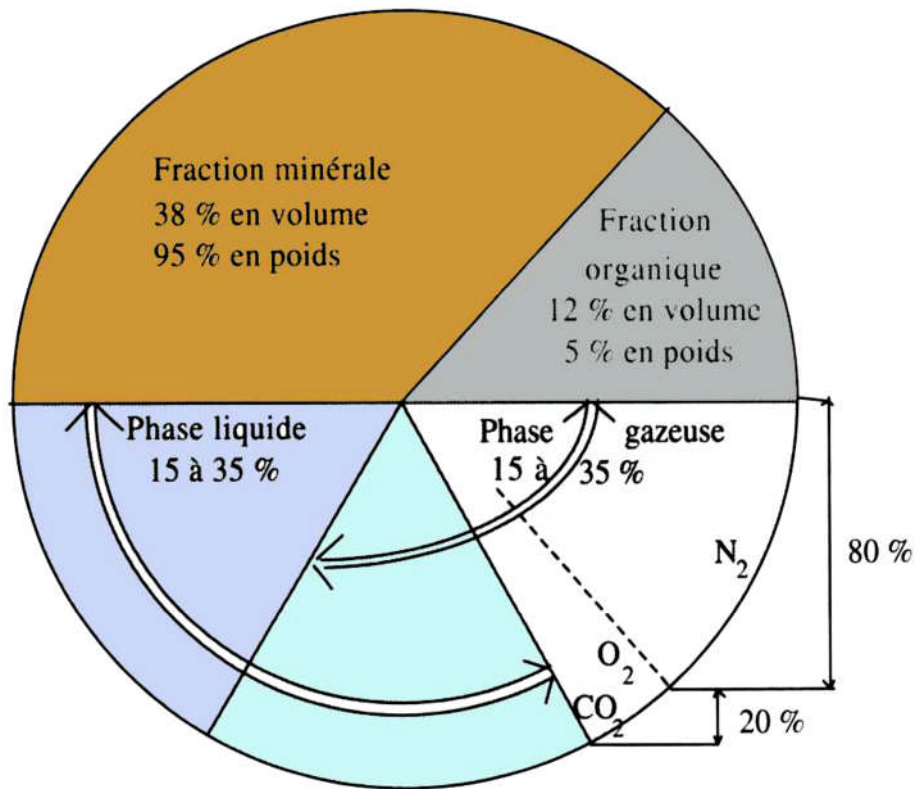
Il représente une interface particulièrement importante pour l'homme et l'ensemble des êtres vivants. Avec les sédiments et les eaux de surface, ils constituent des niches écologiques extraordinaires en termes de productivité de matières vivantes, de diversité biologique et de réservoirs de matières organiques (DOMINIQUE, 1997)

Comme l'illustre le tableau ci-dessous, le sol est constitué de trois fractions :

Tableau I : Les différents constituants du sol (GOBAT *et al.*, 2003).

CONSTITUANTS SOLIDES		CONSTITUANTS LIQUIDES	CONSTITUANTS GAZEUX
Constituants minéraux	Constituants organiques	Solution du sol	Air du sol
<p><u>Terre fine du sol</u> :</p> <p>Argiles, limons fins, limons grossiers, sables fins, sables grossiers.</p>	<p><u>Matière organique fraîche</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Constituants des tissus végétaux, cellulose, hémicellulose, tanins... • Déjections animales et animaux morts 	<p><u>Eau du sol</u></p> <p><u>Éléments solubles dissouts</u> :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Substances organique (acides organiques, sucres,...) • Ions dans l'eau du sol : Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, NO³⁻ 	<p><u>Constituants de l'air</u> : O₂, N₂, CO₂</p> <p><u>Gaz issus de l'activité des animaux du sol et des processus de décomposition</u> :</p> <p>CO₂, CH₄, H₂....</p>
<p><u>Éléments grossiers</u> :</p> <p>Graviers, Cailloux, Pierres, Blocs ...</p>	<p><u>Matière humique</u> :</p> <p>Matières organiques transformées</p>		

Le sol est donc un milieu triphasique, (solide, liquide et gazeux), poreux, organo-minéral dont la composition moyenne selon ROBERT et CHENU (1992) est schématisée dans la figure suivante :



Composition moyenne du sol

Figure 1 : La composition moyenne des différentes fractions du sol (ROBERT M et CHENU, 1992)

2. La pollution du sol

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 (CHASSIN *et al.*, 1996).

Selon JEANNOT *et al.* (2000), on distingue deux types de pollutions du sol.

2.1. La pollution localisée

Elle se distingue par la présence ponctuelle dans les sols de substances dangereuses, déversements, fuites ou dépôt de déchets.

2.2. 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 :

- **Les pollutions accidentelles** c'est le déversement ou dépôt ponctuel de polluants, ou une grande quantité de polluant est déversée en fonction du temps.
- **Les pollutions chroniques** c'est l'apport continu de contaminants par fuite ou lessivage, dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle.

3. Les polluants du sol

3.1. Définition

Un polluant est une substance naturelle ou de synthèse, minérale ou organique. Elle peut être absorbée par voie foliaire ou racinaire chez les plantes et par inhalation, ingestion ou contact chez les animaux.

Elle provoque une intoxication des organismes affectés en perturbant une fonction vitale pouvant entraîner la mort (RAMADE, 2000).

3.2. Types de polluants

Les polluants des sols sont très variés et sont aussi souvent toxiques pour l'homme. À l'instar des pesticides, des phtalates, de solvants chlorés, de l'azote, de certains éléments traces comme le cuivre, le mercure ou l'argent. Les polluants peuvent à la fois être présents naturellement dans les sols ou être le résultat d'activités humaine (ROGER et JACQ, 2000).

Deux groupes de polluants sont communément rencontrés dans les matrices contaminées :

- Les polluants organiques.
- Les polluants inorganiques.

3.2.1. Les polluants organiques

3.2.1.1. Les hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques ne contenant que du carbone et de l'hydrogène, associés sous la forme de molécules d'une grande diversité (VANDECASTEELE, 2005). Ils regroupent différents produits pétroliers (pétrole brute, pétrole raffiné, kérosène, fuel, lubrifiants, huiles à moteurs). Selon SCHADECK (2007), cette famille inclut :

- Les hydrocarbures aliphatiques.
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)
- Les hydrocarbures halogénés volatils (COV)
- Les hydrocarbures aromatiques volatils (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène)

3.2.1.2. Les produits organiques industriels

D'après BOUCHESEICHE *et al.* (2002), les produits les plus utilisés sont :

- Les polychlorobiphényles ou PCB.
- Les phénols et les chlorophénols.
- Les phtalates
- Les phytosanitaires

3.2.2. Les polluants inorganiques

Ce sont les métaux lourds dont l'expression «*métal lourd*» désigne pour les chimistes des métaux de numéro atomique élevé, de densité supérieure à 5g/cm^3 et qui forment des sulfures insolubles.

Les métaux lourds sont présents de façon naturelle dans les sols. Ils proviennent en grande partie de l'altération de la roche mère du sous-sol. Toutefois, les concentrations les plus importantes rencontrées dans les sols sont liées à l'activité humaine.

Le chrome, le manganèse, le cobalt, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel et le zinc sont les métaux lourds les plus rencontrés dans le sol.

Dans le domaine de l'environnement, on associe fréquemment aux métaux lourds l'arsenic qui est un métalloïde lourd (DOMINIQUE, 1997)

3.3. Comportement des polluants dans les sols

Un certain nombre de processus influencent le comportement et la migration des contaminants dans les sols. Il s'agit essentiellement de :

- Réactions d'échange (volatilisation, adsorption-désorption, complexation, dissolution-précipitation...) entre les phases solide et gazeuse du sol (HIMEL *et al.*, 1990).
- Réactions de dégradation comme la photolyse, l'hydrolyse chimique et la biodégradation. (MÄNNISTÖ *et al.*, 1999).
- Phénomènes de transfert des polluants et de leurs produits de dégradation vers l'atmosphère par volatilisation, vers les eaux de surface par ruissellement, vers les eaux souterraines par lixiviation ou écoulement gravitaire (polluants organiques liquides immiscibles à l'eau), vers les plantes par absorption racinaire.

La figure 2 résume les différents processus qui influencent sur le comportement des polluants dans le sol.

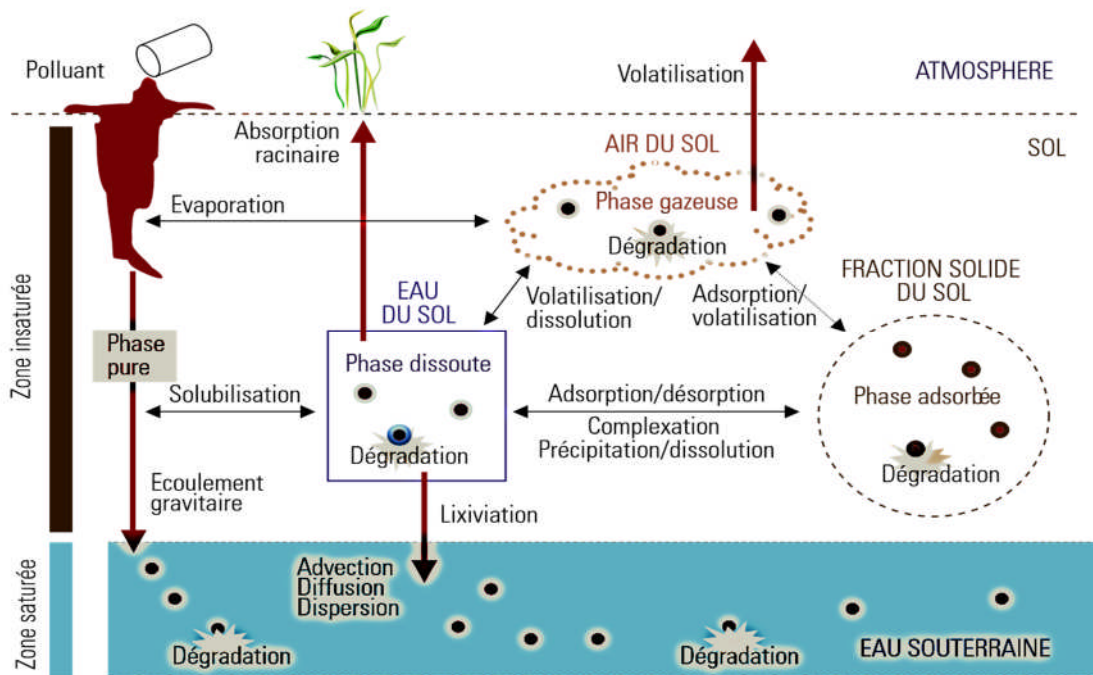


Figure 2 : Représentation schématique des processus influençant le devenir des polluants dans les sols (LICHTFOUSE, 1997).

4. La dépollution des sols

4.1. Définition

La dépollution désigne l'élimination des pollutions et des contaminations des milieux ambiants tels les sols, les sédiments ou les eaux de surface. Les enjeux de la dépollution sont souvent financiers mais aussi d'intérêt général (protection de la santé publique et de l'environnement) (GUELTON, 1999).

Les différentes techniques de dépollution et leurs caractéristiques sont présentées ultérieurement.

4.2. Les différentes techniques de dépollution

Selon COLOMBANO *et al.* (2010), les différentes techniques de dépollution peuvent être classées en fonction de la nature du polluant et des procédés employés.

4.2.1. Classement en fonction de la nature des procédés employés

Les différentes techniques de dépollution peuvent être classées en fonction de la nature des procédés employés, à savoir :

4.2.1.1. Les procédés physiques

Le principe consiste à utiliser des fluides (eau ou gaz), présents dans le sol ou injectés, comme vecteur pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser

4.2.1.2. Les procédés chimiques

L'utilisation des propriétés chimiques des polluants à l'aide de réactions appropriées, les inerte (précipitation), les détruire (oxydation) ou les séparer du milieu pollué (surfactants).

4.2.1.3. Les procédés thermiques

La chaleur permet de détruire le polluant (exemple : incinération), l'isoler (désorption thermique, thermolyse), ou le rendre inerte (exemple : vitrification).

4.2.1.4. Les procédés biologiques (bioremediation)

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries (VOGEL *et al.*, 2001).

La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant qui sera utilisé comme source de carbone la décontamination se fait *in situ* en introduisant dans le site de traitements les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex situ* dans le cas d'un sol excavé traité (COLIN, 2000)

Les microorganismes utilisés en bioremédiation proviennent de milieux très variés et peuvent vivre dans des conditions extrêmes : des températures en dessous de 0°C ou au contraire, très élevées, dans des milieux inondés ou en plein désert, en présence d'un excès d'oxygène ou milieu anaérobie. En raison de leur pouvoir d'adaptation, ces microorganismes sont utilisés pour éliminer les composés xénobiotiques.

Parmi les bactéries aérobies reconnues pour leur pouvoir de dégradation, nous pouvons citer celles appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas* et *Mycobacterium*.

Elles peuvent dégrader les pesticides, les hydrocarbures, les alcanes et les composés polyaromatiques. Souvent, elles utilisent le polluant comme source de carbone et d'énergie (ABDELLEY, 2007).

Si la flore locale est inadaptée à la dégradation des polluants, des souches bactériennes performantes allochtones peuvent être ajoutées au sol (SCOW, 2003).

Les procédés de traitements biologiques sont :

4.2.1.4.1. La bioaugmentation

Cette technologie consiste à introduire des cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé dans l'objectif d'augmenter la biodégradation des contaminants organiques.

Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. La culture peut comprendre une ou plusieurs espèces de microorganismes (VINAS *et al.*, 2002).

4.2.1.4.2. La biostimulation

Cette technologie consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes (présentes dans le sol ou dans les eaux souterraines) par apport de nutriments et par ajustement des conditions du milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité) (ABDELLEY, 2007).

4.2.1.4.3. Le compostage

Selon ABDELLY (2007), il peut être défini comme un procédé biologique contrôlé qui assure la transformation et la valorisation des matières organiques (sous-produits de la biomasse, déchets organiques d'origine biologique) en un produit stabilisé et hygiénique

C'est la fermentation des ordures ménagères organiques (résidus alimentaires) et des déchets verts (feuillages, résidus de jardinage) afin de produire un compost réutilisable en agriculture pour fertiliser la terre.

4.2.1.4.4. La phytoremédiation

Selon RUSTY (2014) cette technique repose sur le principe de la combinaison de l'utilisation de plantes et de microorganismes pour réduire les niveaux de ces contaminants. C'est une technologie très coûteuse, mais beaucoup moins destructrice pour le sol que les techniques d'ingénierie. Un taux acceptable de polluants est atteint généralement en moins d'une décennie.

Cependant, cette technique possède des limites : son application est restreinte à des zones où le niveau de pollution n'est pas toxique pour les plantes et contenant les racines des plantes



Chapitre II
Les phtalates

1. Définition du groupe des phtalates

On désigne par phtalates un ensemble de diesters de l'acide ortho-phtalique associé avec des alcools ayant des radicaux aliphatiques ou aromatiques dont le nombre de carbones varie de 1 à 13, les radicaux substitués étant symétriques ou non (USDHHS, 2003).

Les phtalates sont donc composés d'un groupement benzénique et de deux groupements carboxylates dont la chaîne alkyle peut varier (méthyle, éthyle, butyle, hexyle,... etc).

La figure 4 présente la formule développée de quelques phtalates ainsi que celle de l'acide phtalique et de ses esters (figure 3).

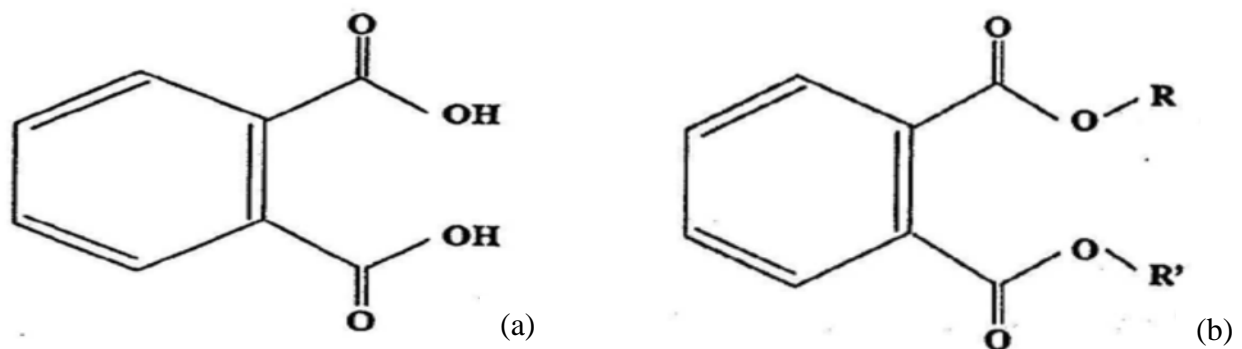


Figure 3 : (a) L'acide phtalique, (b) la formule des esters de l'acide phtalique (XUEPING *et al.*, 2014)

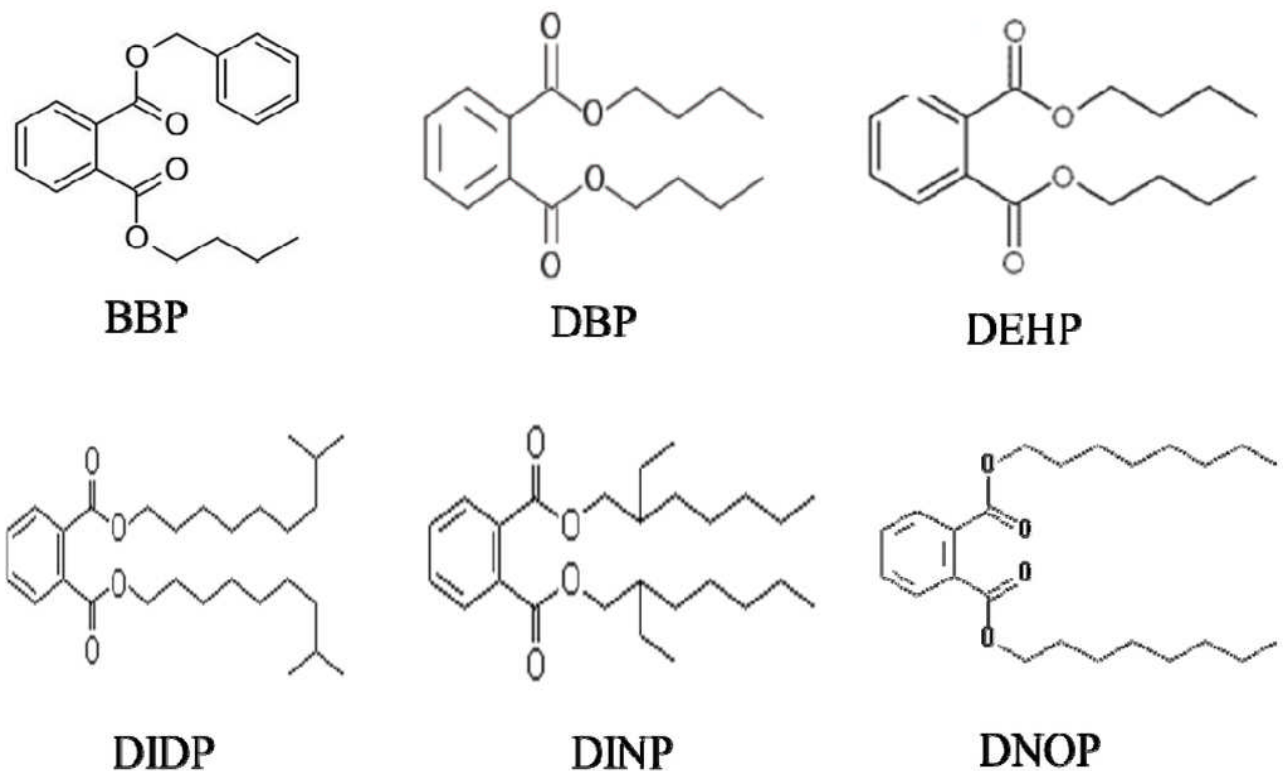


Figure 4 : Formules développées de quelques phtalates (XUEPING *et al.*, 2014)

Les phtalates les plus fréquemment rencontrés et leur nomenclature sont présentés dans le tableau II.

Tableau II : Nomenclature et structure des six phtalates (STAPLES *et al.*, 1997)

Nom	Acronyme	Numéro CAS	Formule brute
Diméthyle phthalate	DMP	131-11-3	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Diéthyle phthalate	DEP	84-66-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄
Di-n-butyle phthalate	DnBP	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
Butyle benzyle phthalate	BBP	85-68-7	C ₁₉ H ₂₀ O ₄
Di-(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Di-n-octyle phthalate	DnOP	117-84-0	C ₂₄ H ₃₈ O ₄

2. Caractères physico-chimiques

À température ambiante, les phtalates sont des liquides organiques, visqueux et transparents. Ils n'émettent dans l'atmosphère que très peu de vapeur. Ils ont une forte affinité pour les graisses et les alcools lourds (esters, acétone, chloroforme...). Excepté pour le DMP, ils ont tous une température de fusion inférieure à -25°C. Les phtalates possèdent des températures d'ébullition comprises entre 280 et 390°C (HOWARD *et al.*, 1985). Le tableau III résume ces différents caractères physico-chimiques.

Tableau III : Caractéristiques physiques de quelques phtalates (STAPLES *et al.*, 1997 ; MACKINTOSH *et al.*, 2004)

Composé	Nombre de C par chaîne	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité dans l'eau (mg.L ⁻¹) à 25 °C	Pression de Vapeur saturante (mm Hg) à 25 °C
DMP	1	194	284	4,2.10 ³	2.10 ⁻³
DEP	2	222	298	1,1.10 ³	1.10 ⁻³
DnBP	4	278	340	11.2	2,7.10 ⁻⁵
BBP	4 - 6	312	370	2.7	5.10 ⁻⁶
DEHP	8	391	386	3.10 ⁻³	1.10 ⁻⁷
DnOP	8	391	390	5.10 ⁻⁴	1.10 ⁻⁷
Composé	Constante de Henry (atm.m ³ .mol ⁻¹)	Température de fusion (°C)	Densité à 20°C	Koc (L.kg ⁻¹) (sol/sédiment)	Koc (L.kg ⁻¹) (matière en suspension)
DMP	1,22.10 ⁻⁷	5,5	1,192	55 - 360	< 5.10 ⁴
DEP	2,66.10 ⁻⁷	-40,0	1,118	69 – 1,2.10 ³	7,9.10 ⁴
DnBP	8,83.10 ⁻⁷	-35,0	1,042	1,4.10 ³ – 1,5.10 ⁴	1,2.10 ³ – 1,6.10 ⁵
BBP	7,61.10 ⁻⁷	-35,0	1,111	9.10 ³ – 1,7.10 ⁴	1.10 ⁵
DEHP	1,71.10 ⁻⁵	-47,0	0,986	8,7.10 ⁴ – 5,1.10 ⁵	2.10 ⁶
DnOP	1,03.10 ⁻⁴	-25,0	0,978	(-)	2,2.10 ⁴ – 1.10 ⁶

3. Applications industrielles

Les phtalates sont des plastifiants nécessaires pour la fabrication des produits en chlorure de polyvinyle (PVC) souple. Ils sont également utilisés dans la composition d'autres polymères tels que l'acétate de polyvinyle, l'acétate de cellulose et le polyuréthane (STAPLES *et al.*, 1997). Le tableau IV indique les utilisations de différents phtalates.

Tableau IV : Description des principaux phtalates pour usage commercial et industriel (Communiqué toxicologique, Institut National de Santé Publique du Québec, 2004).

CATÉGORIE DE PHTALATES	ABREVIATION	EXEMPLES D'UTILISATION
Diméthyle phthalate	DMP	Déodorants.
Diéthyle phthalate	DEP	Parfums, déodorants, gels et mousses pour les cheveux, shampooings, savons, fixatifs pour cheveux, vernis à ongle, lotions pour le corps.
Di-n-butyle phthalate	DnBP	Secteur automobile (plastifiant et solvant pour les peintures) ; Secteur du bâtiment (mastic d'étanchéité, revêtements de surfaces intérieures et extérieures, fibres de verre) ; Industrie textile (lubrifiant des fibres textiles, assouplissant des encres d'impression) ; Secteur médical (enrobage des médicaments) ; Agent anti-moussant dans les insecticides ; adhésifs pour papier.
Butyle benzyle phthalate	BBP	Parfums, fixatifs pour cheveux, adhésifs et colles, produits pour l'automobile, revêtement de sol en vinyle.
Di-(2-ethylhexyl) phthalate	DEHP	Parfums, produits flexibles en PVC (rideau de douche, tuyau d'arrosage, couche, revêtements de sols et toitures, contenant pour la nourriture, film d'emballage alimentaire, sac pour unités de sang, cathéter, tubulure pour soluté, gants, etc.)
Di-n-octyle phthalate	DnOP	Produits flexibles à base de plastique (revêtements de sols, tuyaux d'arrosage, jouets, gants, chaussures, produits d'emballage alimentaire,...)

4. Sources et voies d'exposition aux phtalates

La population humaine est exposée aux phtalates par de multiples voies. Les voies d'exposition les plus probables varient en fonction des phtalates : voie orale, cutanée, respiratoire et parentérale (SWAN, 2008).

L'exposition environnementale aux phtalates peut provenir du contact direct avec l'air, l'eau ou encore la nourriture. La libération des phtalates dans ces divers médias est possible en raison du faible lien covalent de ces composés aux polymères. L'ingestion d'aliments ayant été en contact avec des emballages contenant des phtalates demeure la principale source d'exposition pour la population générale (U.S. Department of Health and Human Services, 2003).

Selon une étude publiée en (2003) par un groupe de chercheurs allemands, 12 % de la population générale excéderait la dose journalière tolérable par ingestion qui est recommandée par la Communauté Européenne pour le DEHP (37 µg/kg poids/jour) (KOCH *et al.*, 2003).

La figure 5 schématise les différentes voies d'exposition aux phtalates. Les mesures des concentrations urinaires en métabolites ont en outre démontré l'exposition généralisée de la population à ces plastifiants (WORMUTH *et al.*, 2006).

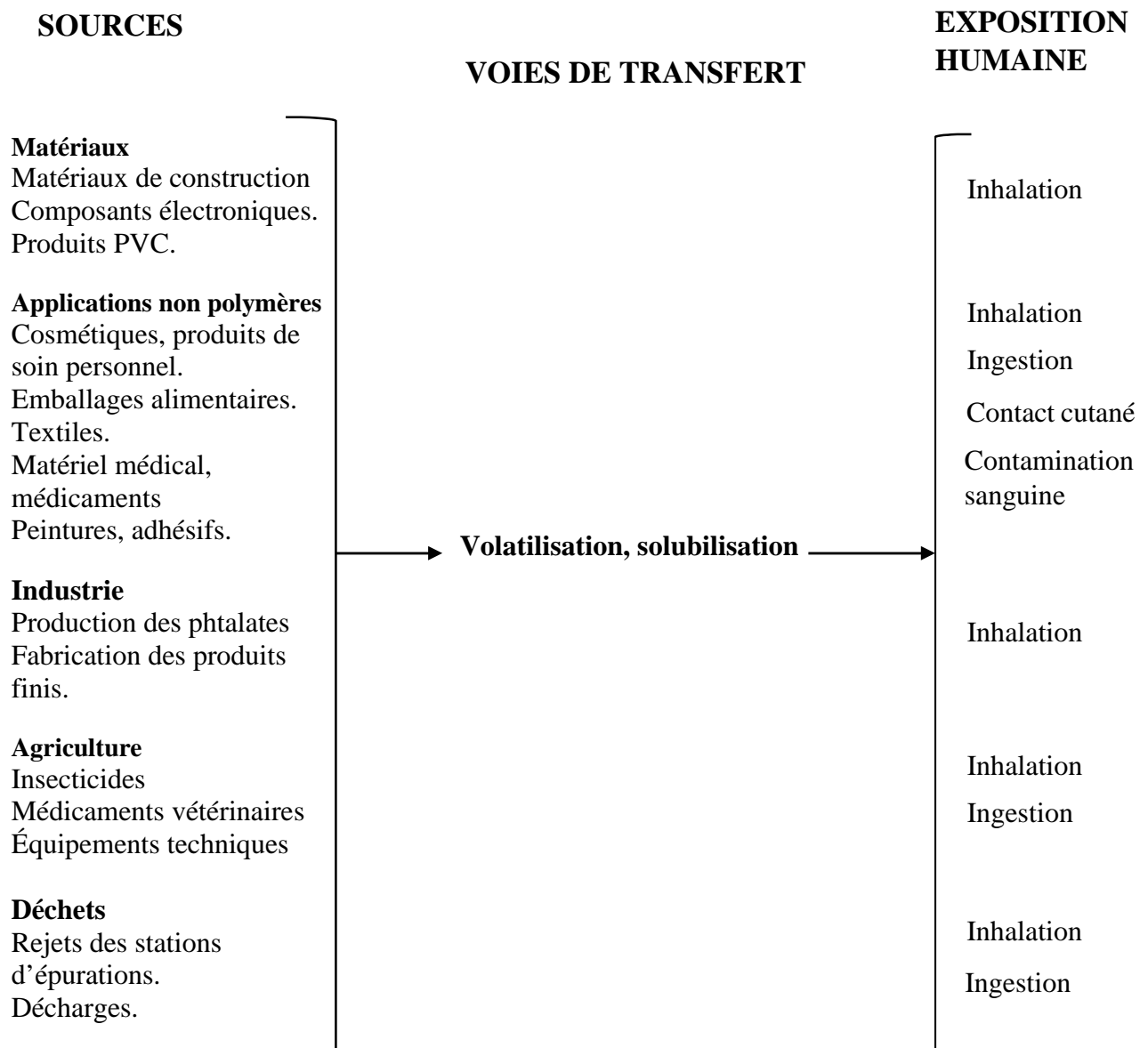


Figure 5 : Sources et voies d'exposition aux phtalates pour l'Homme (WORMUTH *et al.*, 2006).

5. Effet des phtalates sur l'homme et l'environnement

5.1. Effets des phtalates sur la santé humaine

5.1.1. Toxicité

Les effets toxicologiques des phtalates varient selon le type de composé. D'après LOVEKAMP-SWAN et DAVIS (2003), le DEHP possède un potentiel de toxicité plus élevé que les autres phtalates incluant le DBP (la cardiotoxicité, l'hépatotoxicité et la néphrotoxicité), bien qu'il ne provoque pas d'effets sérieux lorsqu'il entre en contact avec la peau.

5.1.2. Effets atypiques

Parmi les effets atypiques, une irritation des muqueuses et une action narcotique par dépression du système nerveux central ont été décrits chez les Mammifères (LAHOSSINE, 2000).

De plus, le DEHP peut provoquer une hypotrophie fœtale et une augmentation de la masse des reins chez le rat (KAVLOCK *et al.*, 2002 d).

5.1.3. Effets cancérogènes

D'après KAVLOCK *et al.* (2002 a), le BBP aurait un potentiel cancérogène chez le rat mâle, en particulier pour le tissu pancréatique.

L'exposition au DEHP et au DnBP a été associée à une augmentation de l'incidence de carcinome hépatocellulaire chez les Rongeurs. Il agirait vraisemblablement via le récepteur du facteur d'activation des peroxyosomes (organites cellulaires chargées de la détoxification). (KAVLOCK *et al.*, 2002c).

Cependant, il est confirmé que cet effet est négligeable chez l'être humain puisque nous sommes moins sensibles que les souris ou les rats à une induction de la prolifération des peroxyosomes (MOORE *et al.* 2002).

Le BBP aurait un potentiel cancérogène chez le rat mâle, en particulier pour le tissu pancréatique (Kavlock *et al.* 2002a).

5.1.4. Effets tératogènes

Le BBP administré par intubation gastrique à la dose de 600 mg.kg⁻¹ à des rats femelles pendant les premiers jours de la gestation provoque chez les nouveau-nés, des anomalies osseuses : côtes surnuméraires, déformations vertébrales ou malformations de la voûte palatine (EMA *et al.*, 1995).

L'exposition aux phtalates pendant la vie intra-utérine chez le rat, par administration de BBP dans l'eau de boisson des femelles gestantes (1 mg.L⁻¹), provoque des malformations fœtales affectant l'appareil génital mâle ont été observées (SHARPE *et al.*, 1995).

L'administration orale de DnBP chez plusieurs espèces de Mammifères pendant la gestation, conduit à une augmentation de la mortalité embryonnaire, à l'apparition d'anomalies morphologiques et à une réduction du poids corporel de la descendance. L'ingestion de DEHP chez le rat et la souris pendant la gestation provoque des morts embryonnaires, des malformations (squelette, yeux, système cardiovasculaire) et des retards de croissance et de développement (KAVLOCK *et al.*, 2002d).

5.1.5. Effets perturbateurs endocriniens

Les phtalates sont impliqués dans effets perturbateurs endocriniens et peuvent à ce titre, entraîner des troubles de la reproduction, du développement et de l'immunité (LUND., 2000).

Les effets des perturbateurs endocriniens paraissent dans l'ensemble, paradoxaux : ils peuvent mimer ou au contraire, bloquer l'action des hormones naturelles. Ils semblent affecter la fonction thyroïdienne de manière antagoniste dans certaines études sur du tissu thyroïdien *in vitro* et chez les rats (HINTON *et al.*, 1986).

Des administrations répétées de DnOP à des rats par la nourriture durant 90 jours provoquent des effets sur la fonction thyroïdienne (KAVLOCK *et al.*, 2002b).

5.2. Effets des phtalates sur l'environnement

Compte tenu des grandes quantités utilisées dans les industries, les phtalates sont largement retrouvés dans les différents compartiments de l'environnement. Les principales voies d'apport des phtalates dans l'environnement sont les émissions dans l'air et les pertes par lessivage à partir de certaines applications industrielles. Parmi les sources de rejet dans l'air, on peut noter les émissions au cours de la fabrication et de l'utilisation de phtalates et celles qui sont dues à la combustion incomplète des matières plastiques. Ils se retrouvent ensuite dans les eaux, les sols et les sédiments (WEBBER et LESAGE, 1989).

En 2011, une équipe de chercheurs français a trouvé une forte contamination des écoulements d'eaux pluviales issues de bassins versants par 55 substances prioritaires en région parisienne, parmi lesquelles on retrouve les phtalates. Le rejet d'eaux pluviales fortement polluées et non traitées peut avoir un impact sur les eaux réceptrices et contribuer à la contamination des sédiments de la Seine (ZGHEIB *et al.*, 2011).

Les phtalates sont hydrophobes, ont une forte affinité pour les graisses et les alcools lourds, ne sont pas liés de façon covalente aux matrices des produits, ils peuvent donc facilement migrer. Bien que biodégradables dans l'environnement, ils peuvent persister plus longtemps dans certains milieux comme dans les sédiments, ce qui rend plus difficile leur dégradation (Viala et Botta, 2005).

6. Processus de dégradation

On distingue deux types de dégradation dans le milieu naturel : la dégradation abiotique s'effectuant sans l'intervention d'organismes vivants et la biodégradation qui est effectuée soit par les microorganismes soit par les eucaryotes.

6.1. Dégradation abiotique

6.1.1. L'hydrolyse

Cette réaction est négligeable dans les solutions à pH neutre mais elle est catalysée par les acides et surtout les bases et également par certains ions ou catalyseurs organiques. L'hydrolyse est d'autant plus difficile que la longueur des chaînes carbonées augmente. Dans les conditions environnementales, l'hydrolyse n'est pas une voie de dégradation majeure pour les phtalates (SCHWARZENBACH *et al.*, 1992).

La réaction d'hydrolyse des esters phtaliques peut être considérée comme une réaction en deux temps, produisant d'abord le mono ester et un alcool libre et dans un second temps, en créant l'acide phtalique et un deuxième alcool libre (STAPLES *et al.*, 1997).

6.1.2. La photolyse

En milieu aqueux, la photolyse est une réaction faisant intervenir les rayonnements ultraviolets (λ de 400 à 280 nm). La réaction peut se faire par action directe des rayonnements (absorption) ou bien par l'intermédiaire d'espèces chimiques réactives telles que les ions superoxyde (WOLFE *et al.*, 1980b).

La photolyse est très importante dans l'atmosphère où le processus indirect par attaque de radicaux libres prédomine (KELLY *et al.*, 1994).

Pour ce processus de dégradation, à l'opposé de tous les autres, ce sont les molécules ayant les chaînes carbonées les plus longues qui sont le plus rapidement photo-oxydées.

Le tableau suivant donne la demi-vie des différents composés phtaliques lors de la dégradation abiotique.

Tableau V : Demi-vies lors des phénomènes de dégradation abiotique (STAPLES *et al.*, 1997)

Composé	Demi-vie (années) par hydrolyse aqueuse	Demi-vie (jours) par photolyse atmosphérique	Demi-vie (jours) par photolyse aqueuse
DMP	3,2	9,3 - 93	
DEP	8,8	1,8 – 18	152 - 4380
DnBP	22	0,6 - 6	
BBP	< 0,3	0,5 - 5	
DEHP	2000	0,2 – 2	44 - 548
DnOP	107	0,3 – 3	

6.2. Biodégradation

La biodégradation est un processus critique affectant le devenir environnemental des esters phtaliques. De nombreuses recherches ont été conduites sur la biodégradabilité de cette classe de produits chimiques durant ces dernières décennies. Il a été montré que des micro-organismes provenant de divers habitats pouvaient dégrader ces esters phtaliques et leurs intermédiaires de dégradation (NOMURA *et al.*, 1989 et YAN *et al.*, 1995). Cette biodégradation peut être faite par des micro-organismes ou par des eucaryotes.

6.2.1. Micro-organismes

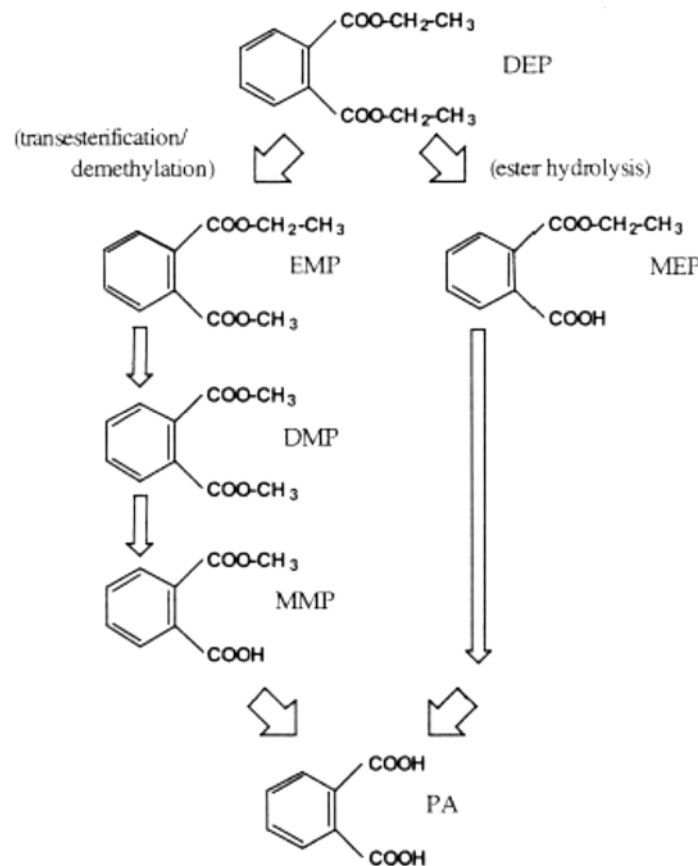
EJLERTSON et SVENSSON (1995) ont montré que les phtalates pouvaient être dégradés par des microorganismes aérobies et anaérobies (bactéries, actinomycètes). Quels que soient les organismes concernés, l'hydrolyse est la première étape, elle permet d'obtenir le monoester de phtalate et un alcool libre.

En anaérobiose, le monoester est dégradé en acide phtalique qui finalement suit la voie catabolique du benzoate pour aboutir après rupture du cycle, à l'acétate.

En aérobiose, l'acide phtalique est dégradé en dihydroxyphtalate conduisant au procatéchuate pour finalement aboutir après rupture du cycle, au pyruvate et à l'oxaloacétate si les hydroxyles sont en ortho ou à l'acétyl CoA et au succinate si les hydroxyles sont en méta (STAPLES *et al.*, 1997).

Par tests *in vitro* avec des souches bactériennes aérobies, en considérant la dégradation primaire (disparition du phtalate parent), les composés les plus légers : DMP, DEP, DnBP et BBP disparaissent à 90 % en une semaine et en 12 jours pour les composés à masse moléculaire plus élevée. La dégradation ultime (minéralisation) survient en 28 jours (SCHOLTZ, 1994).

Les schémas suivants décrivent les voies de dégradation du Di éthyle phtalates en acide phtaliques et la dégradation de ce dernier dans l'environnement.



DEP : Di-éthyle phtalate

DMP : Di-méthyle phtalate

MEP : mono-éthyle phtalate

MMP : mono-méthyle phtalates

EMP : Ethyl-méthyle phtalates

PA : Acide phtalique

Figure 6 : Les voies de dégradation du Di-éthyle phtalates (CARTWIRIGHT *et al.*, 2000)

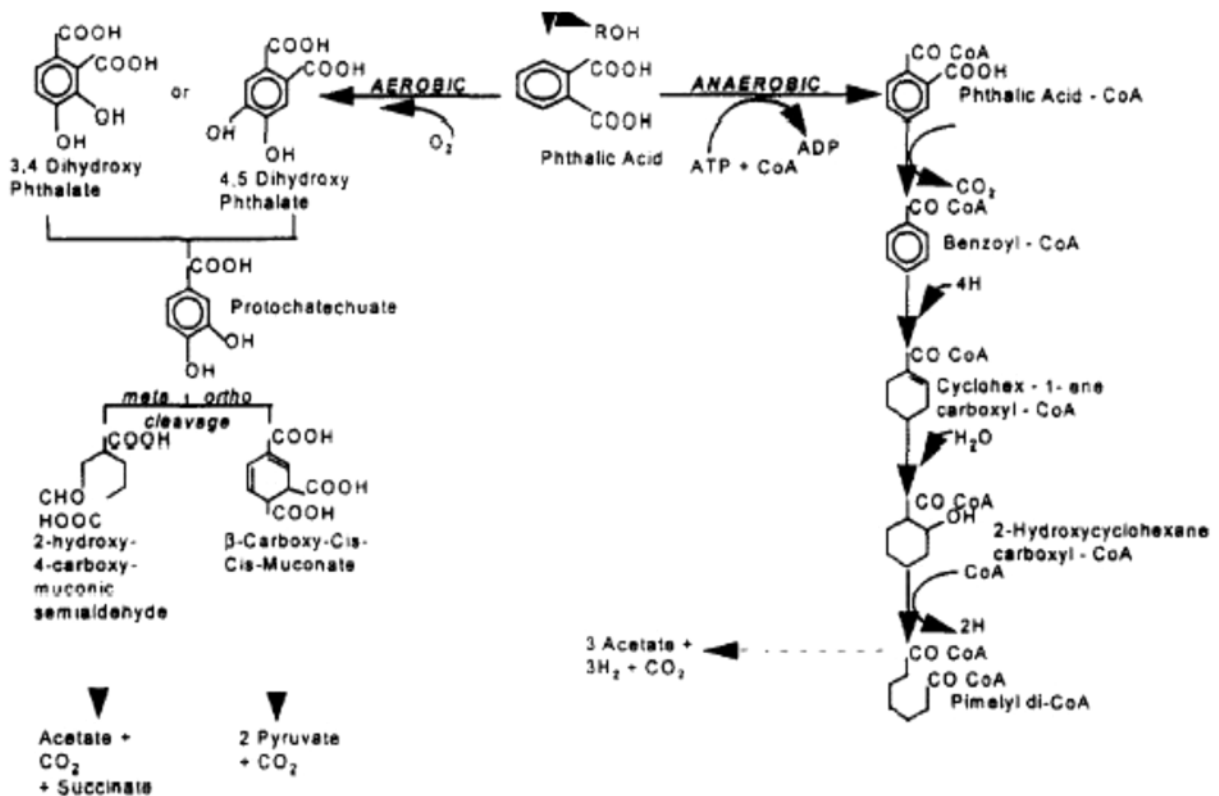


Figure 7 : Biodégradation de l'acide phtalique dans l'environnement (STAPLES *et al.*, 1997).

Plusieurs micro-organismes ont été rapportés pour utiliser tous les phtalates et leurs esters comme seule source de carbone et d'énergie. Les esters de phtalates sont métabolisés aux phtalates par des estérases (KEYSER *et al.*, 1976 ; NIAZI *et al.*, 2001 ; VEGA et BASTIDE 2003 ; MARUYAMA *et al.*, 2005).

Bien que la nature et l'étendue de la dégradation du DEHP peut varier, de nombreuses souches pouvant métaboliser le DEHP ont été isolées à partir de divers environnements, on citera quelques souches comme *Bacillus* étudié par PRIYA et JAYACHANDRAN (2012), *Microbacterium* par CHEN *et al.* (2007), *Rhodococcus* par CHAO et CHENG (2007) et *Pseudomonas* par ZENG *et al.* (2002).

6.2.2. Eucaryotes

L'élimination directe du phtalate d'origine est très limitée. La capacité de biodégradation des phtalates qui favorise leur élimination urinaire ou biliaire, augmente avec le degré de différenciation des organismes et limite l'importance de la bioaccumulation. Ainsi, les capacités de biotransformation varient comme suit : Algues < Cnidaires < Mollusques < Crustacés < Poissons (WOFFORD *et al.*, 1981).

La première étape qui a lieu dans les branchies chez les Poissons et dans la lumière du tube digestif chez les Mammifères est l'hydrolyse conduisant au monoester et à un alcool libre. La suite des transformations a lieu essentiellement dans les tissus hépatique et rénal, après absorption du monoester et de l'alcool. L'alcool est oxydé en acétate + CO₂ par β -oxydation. Le monoester résultant peut soit être directement éliminé, soit suivre une oxydation de la chaîne carbonée à différents niveaux possibles. Ensuite, survient une conjugaison, notamment avec l'acide glucuronique qui représente la phase ultime de la biodégradation (BARRON *et al.*, 1995).

La figure suivante résume le processus de dégradation dans le corps d'un composé phtalique comme le DEHP suite à une exposition orale.

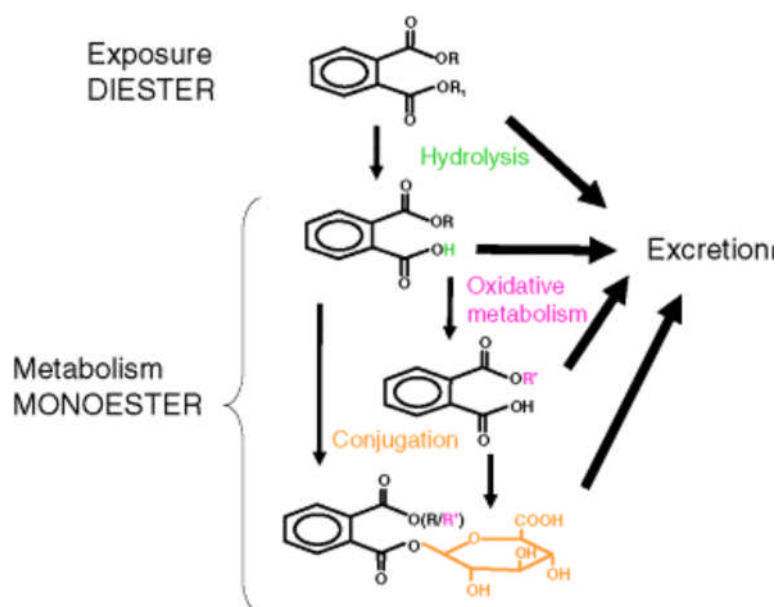


Figure 8 : Processus de dégradation du DEHP (SHMITZER *et al.*, 1988)



Chapitre III
Le Chrome

1. Généralités

Le chrome est un métal lourd dont la pollution peut engendrer beaucoup de nuisances, on donnera dans ce qui suit quelques notions relatives à son origine et les différents moyens de remédiation.

1.1. Caractéristiques du chrome

Les tableaux VI et VII résument les différents caractères physico-chimiques du chrome et ses dérivés.

Tableau VI : caractères physico-chimiques du chrome (LIDE., 2009)

Numéro atomique	24
Masse atomique	51,996 g.mol ⁻¹
Électronégativité de Pauling	1,6
Masse volumique	7,19 g.cm ⁻³ à 20°C
Température de Fusion	1875 °C
Température d'ébullition	2672 °C
Rayon atomique (van der Waals)	0,127 nm
Rayon ionique	0,061 nm (+3) ; 0,044 nm (+6)
Isotopes	5
Énergie de première ionisation	651,1 kJ.mol ⁻¹
Potentiel standard	- 0,71 V (Cr ³⁺ / Cr)

Tableau VII : Chrome et ses dérivés (INERIS., 2005).

Substance chimique		N° CAS	Synonymes	Forme physique
Chrome élémentaire	Chrome Cr	7440-47-3	Chromium	solide cristallisé (structure cubique centrée)
	Composés du Chrome (hexavalents)	Trioxyde de chrome CrO ₃	1333-82-0	Chromic anhydride Chromic oxide Chromic trioxide Chromium oxide Chromium oxide (Cr O ₃) Chromium (VI) oxide Chromium trioxide Chromium (6+) trioxide
Chromate de sodium Na ₂ CrO ₄		7775-11-3	Chromium disodium oxide Chromium sodium oxide Disodium chromate Sodium chromate (VI)	solide cristallisé (structure rhombique bipyramidale)
Dichromate de sodium Na ₂ Cr ₂ O ₇		10588-01-9	Bichromate de sodium Disodium dichromate Disodium dichromium hepta-oxide	solide cristallisé (structure prismatique monoclinique)
Dichromate d'ammonium (NH ₄) ₂ Cr ₂ O ₇		7789-09-5	Bichromate d'ammonium Ammonium bichromate Ammonium dichromate (VI) Di-ammonium dichromate Di-ammonium dichromate hepta-oxide	solide cristallisé (structure prismatique monoclinique)
Dichromate de potassium K ₂ Cr ₂ O ₇		7778-50-9	Potassium bichromate Dipotassium dichromate Dipotassium bichromate Dipotassium dichromium hepta-oxide	solide cristallisé (structure monoclinique ou triclinique)

1.2. Utilisations

Le chrome entre dans la composition d'aciers inoxydables, d'aciers spéciaux et d'alliages, il améliore la dureté des métaux et leur résistance à la corrosion. Les différentes utilisations de ses dérivés sont citées en ci-dessous (INERIS, 2005)

- Le chromate de sodium est employé dans la fabrication d'autres composés de chrome.
- Le dichromate de sodium également utilisé pour produire d'autres composés de chrome sert d'autre part à fabriquer des produits de conservation du bois, des vitamines K, de la cire, et pour la finition de l'état de surface des métaux (chromage électrolytique).
- Le trioxyde de chrome est employé pour la finition de l'état de surface des métaux et dans la fabrication des produits de conservation du bois. Il est d'autre part utilisé pour produire des catalyseurs.
- Le dichromate de potassium sert à fabriquer des teintures, des catalyseurs, des agents colorants pour céramiques. Il est utilisé pour produire du chrome, des pigments et des produits de conservation du bois.
- Le dichromate d'ammonium est utilisé dans la fabrication de bandes magnétiques, de catalyseurs et de pigments.

2. Sources du chrome et comportement dans l'environnement

Le chrome est présent dans l'environnement de manière ubiquitaire. Il s'agit d'un élément largement distribué dans la croûte terrestre, particulièrement concentré dans les roches. Son principal minéral s'appelle la chromite (FeCr_2O_4).

Le chrome existe sous plusieurs degrés d'oxydation, principalement le chrome III (trivalent) et le chrome VI (hexavalent) qui est majoritairement introduit par les activités industrielles. Seuls ces composés sont détectés dans l'environnement en quantités significatives (NIEBOER et JUSYS., 1988).

Le chrome VI est largement transformé en chrome III dans les sols et les sédiments, car il s'adsorbe moins que ce dernier. Cette transformation est favorisée en conditions anaérobiques et un pH faible (SEDLAK et CHAN, 1997 ; PETTINE *et al.*, 1998).

Le chrome n'est pas volatil, ses principales sources d'émission dans l'atmosphère sont l'industrie chimique, la combustion de gaz naturel, d'huile et de charbon et les usines de production de ciment. Ses composés de chrome sont présents sous forme de fines particules qui se déposent progressivement sur les sols et les surfaces aquatiques (LOSI *et al.*, 1998).

Sa majeure partie présente dans les sols ne se dissout pas facilement dans l'eau. La faible fraction soluble se propage en profondeur vers les eaux souterraines. La solubilité du chrome VI est plus importante que celle du chrome III (RAI *et al.*; 1989).

3. Toxicité du Chrome

L'absorption réelle du chrome dépend de nombreux facteurs : l'état d'oxydation, la taille des particules, leur solubilité. Dans la majorité des cas les composés hexavalents du chrome sont plus facilement absorbés que les composés trivalents. Ceci est en partie lié à la meilleure capacité que possèdent les divalents hexavalents à traverser les membranes (BARCELOUX., 1999).

3.1. Effet toxique

L'ingestion de sels de chrome VI entraîne une inflammation massive du tube digestif suivie d'une nécrose s'étendant de la bouche au jéjunum. Ces manifestations d'apparition rapide, en quelques heures peuvent entraîner la mort. Si le patient survit au-delà de 8 jours, les effets majeurs observés sont une nécrose hépatique et rénale. De fortes doses de chrome (VI) induit des vertiges, une sensation de soif, des douleurs abdominales, des diarrhées hémorragiques et dans les cas les plus sévères un coma puis la mort. Une coagulopathie sévère ou une hémolyse intravasculaire peuvent également survenir. Parfois des dysfonctionnements rénaux peuvent subsister même après une période de récupération à la suite d'une intoxication massive au chrome (VI) (OMS IPCS., 1988).

3.2. Pouvoir cancérigène

Le chrome hexavalent peut inhiber l'activité enzymatique de la benzopyrène-hydroxylase. Or des composés capables d'une telle inhibition ont un pouvoir cancérigène (CHRÉTIEN et THIEBLEMONT, 1974).

Chez l'homme, l'exposition à des sels de chrome hexavalent pendant des périodes allant de 2 à 26 ans serait une cause de cancer de l'appareil digestif. Des concentrations élevées de chrome dans le sol ont été reliées à de fortes incidences régionales de cancer de l'estomac (WILLIAMS, 1972).

Compte tenu du nombre de dérivés du chrome, l'Union Européenne a pris en considération les plus courants ayant fait objet de la classification suivante :

- **Catégorie 1 :** Trioxyde de chrome, Chromates de zinc (JOCE, 1996, 2004).
Ce sont des substances que l'on sait être cancérigène pour l'homme
- **Catégorie 2 :** Dichromate de sodium, Dichromate d'ammonium, Chromate de sodium, Chromate de calcium, Dichromate de potassium, Dichloro-dioxyde de chrome, Chromate de strontium, Chromate de potassium (JOCE, 1996, 2004).
Ce sont des substances devant être assimilées à des substances cancérigènes pour l'homme.
- **Catégorie 3 :** Chromate de plomb, Molybdène orange (JOCE, 1998, 2000).
Ce sont des substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles.

3.3. Effets sur la reproduction et le développement

Les seules données connues concernant les effets toxiques du chrome VI sur la fonction de reproduction sont issues d'études réalisées chez la femme exposée professionnellement aux bichromates. Les résultats montrent une augmentation de l'incidence des complications au cours de la grossesse et de la naissance, une toxicose pendant la grossesse ainsi qu'une augmentation des hémorragies postnatales (O'HEANY, 1986).

4. Moyens de remédiation

Les techniques de traitement des sites et sols pollués sont diverses et souvent complexes et coûteuses, le traitement d'un site impliquant presque toujours les mises en œuvres simultanées ou successives de plusieurs procédés. Les techniques les plus utilisées sont décrites ci-dessous :

4.1. Méthodes physico-chimiques

4.1.1. Lavage du sol

Cette technique permet de récupérer les métaux solubles dont le chrome (VI) dans la phase liquide après lavage des terres polluées. On peut utiliser des additifs pour améliorer l'extraction comme des bases, des acides, des surfactants, des agents chélatants (MULLIGAN *et al.*, 2001).

4.1.2. Extraction thermique

Ce type d'extraction est basé sur un procédé appelé Cement Lock développé par l'Institut of Gas Technology aux États Unis. En premier, les sédiments sont placés dans un réacteur à 1200-1600°C pour être fondus, puis refroidis. Le produit est ensuite pulvérisé pour être mélangé à du ciment afin de produire un ciment utilisable en construction. Les gaz issus de ce procédé de traitement sont filtrés pour éliminer les particules qui peuvent contenir des métaux, puis passés sur charbon actif pour retenir les métaux lourds restants.

4.1.3. Electromigration

Cette technique consiste à appliquer un courant de faible intensité entre une cathode et une anode pour faire migrer des ions et de petites particules chargées. Cette technique est applicable aux métaux lourds comme le cuivre, le zinc, l'arsenic, le cadmium et le nickel (MULLIGAN *et al.*, 2001).

L'équipe de LE HECHO *et al.* (1998) ont décrit une technique qui peut être applicable aux sols pollués au chrome. La méthode consiste à extraire le sol et à l'incuber en conditions alcalines afin de limiter l'adsorption des anions chromate entre deux électrodes.

Les différents avantages et inconvénients de chaque technique sont résumés dans le tableau VII.

Tableau VIII : les avantages et inconvénients des techniques physico-chimiques

(IGNATIADIS *et al.*, 2004)

Techniques	Avantages	Inconvénients
Lavage du sol	<ul style="list-style-type: none"> - Technique fiable et éprouvée ; - Applicabilité à de nombreux polluants ; - Coûts d'investissements modérés. 	<ul style="list-style-type: none"> - Utilisation de réactifs dangereux ; - Les solutions utilisées peuvent être des polluants potentiels ; - Après traitement, le sol peut être altéré par rapport à son état initial.
Extraction thermique	<ul style="list-style-type: none"> - Technique moins lourde à mettre en place que l'incinération ; - Technique permettant d'atteindre des profondeurs importantes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Destruction ou perturbation des populations de micro- organismes, et végétation des sols et en périphéries des zones traitées ; - Les coûts de production de température (coûts d'exploitation) sont souvent importants.
Électro-migration	<ul style="list-style-type: none"> - Coût d'exploitation faible ; - Peu consommatrice d'énergie ; - Permet de réduire le volume de boues formé. 	<ul style="list-style-type: none"> - Remplacement périodique des cathodes ; - La concentration en métaux doit être supérieure à 0.1g/l.

4.2. Techniques de Bio-remédiation

La découverte d'organismes pouvant utiliser le chrome et le rendre moins toxique à ouvert la voie à la mise au point de procédés de bio-remédiation notamment pour le traitement des effluents liquides. Pour que ces processus biologiques s'établissent, les organismes requièrent la présence de sels minéraux en tant que nutriments, de sources de carbone, d'azote et de phosphore pour leur métabolisme énergétique. D'autres facteurs comme la température, le pH, etc... ont une influence sur l'efficacité de ces processus (DESJARDIN *et al.*, 2002).

4.2.1. Bio-réduction par les bactéries et les champignons

Différents paramètres ont été évalués pour plusieurs types de bactéries pour accélérer le processus afin de développer des techniques efficaces de bio-remédiation exploitant ces micro-organismes

La première étude sur la réduction du chrome (VI) par une culture bactérienne a été écrite en 1977 par ROMANENKO et KOREN'KOV. La souche isolée a été classée comme étant un *Pseudomonas dechromaticans*.

Depuis les années 80, les chercheurs se sont intéressés aux nombreuses autres bactéries capables de réduire le chrome hexavalent (GVOZDIAK *et al.*, 1986).

Ils proposent des techniques utilisant ces bactéries réductrices de chrome pour le traitement des effluents liquides et plus récemment des sols pollués (LOSI *et al.*, 1994 ; SALUNKHE *et al.*, 1998).

Bopp et Ehrlich (1988) ont montré qu'une culture de la souche L303 de *Pseudomonas fluorescens*, Chr^S car dépourvue du plasmide conférant la résistance au chrome, pouvait réduire le chrome en aérobiose (0,2 mM), après une nuit d'incubation sans chrome, à la même vitesse que les cellules provenant d'une culture de la souche LB300 Chr^R ayant subi le même traitement. Cette expérience prouve donc que résistance au chrome et réduction du chrome ne sont pas nécessairement en relation l'une avec l'autre. Une souche qui réduit le chrome (VI) n'est pas systématiquement résistante.

Certains auteurs pensent que le déterminant est porté par un plasmide. Ce serait le cas pour *Pseudomonas mendocina* MCM B-180 étudiée par DHAKEPHALKAR *et al.* (1996). Si les déterminants sont assez peu connus c'est aussi parce que les mécanismes de réduction du chrome sont nombreux et très diversifiés. Il existe tout d'abord le cas particulier des bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui réduisent le chrome (VI) avec de l' H_2S en condition anaérobie.

C'est un processus que l'on appelle indirect car c'est le métabolite produit par la bactérie qui réduit le chrome. Ensuite, chez d'autres micro-organismes, il existe la réduction du chrome dite directe car effectuée grâce à des protéines (solubles ou membranaires). Cette réduction peut s'effectuer en présence ou en absence d'oxygène. Ce type de réduction est aussi appelé réduction enzymatique.

Récemment, la corrélation entre la disparition de la forme (VI) et l'apparition de la forme (III) vient d'être faite pour une souche d'*Escherichia coli* d'après une étude faite par MCLEAN et BEVERIDGE (2000) et chez les souches *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 et *Pseudomonas fluorescens* LB300 (DESJARDIN *et al.*, 2002).

Le principal axe de recherche pour le traitement des effluents pollués est la mise au point de bioréacteurs où se déroulerait une phase de réduction du Cr(VI) par des bactéries immobilisées sur des surfaces, suivie d'une phase de décantation ou de filtration des précipités de chrome trivalent. La réduction directe du Cr(VI) par les bactéries représente un mécanisme naturel potentiellement utilisable pour la détoxification des eaux et sols contaminés par du chrome (CERVANTES *et al.*, 2001).

D'autres genres bactériens intervenant dans la bioremédiation du Chrome sont cités dans le tableau ci-dessous.

Tableau IX : Réduction du Cr (VI) par différentes bactéries (WANG et SHEN, 1995).

Organismes	condition	références
<i>Achromobacter eurydice</i>	Anaérobie	GVOZDYAK <i>et al.</i> , 1986
<i>Aeromonas dechromatica</i>	Anaérobie	KVASNIKOV <i>et al.</i> , 1988 (a)
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Aérobie	LLOVERA <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus cereus</i>	Anaérobie	GVOZDYAK <i>et al.</i> , 1986
<i>Bacillus sp</i>	Aérobie	WANG ET XIAO, 1995
<i>Bacillus subtilis</i>	Anaérobie	GVOZDYAK <i>et al.</i> 1986
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ATCC 29579	Anaérobie	LOVLEY et PHILLIPS, 1994
<i>Enterobacter cloacae</i>	Anaérobie	OHTAKE <i>et al.</i> , 1990
<i>Escherichia coli</i>	Anaérobie	KVASNIKOV <i>et al.</i> , 1988 (b)
<i>Escherichia E. coli</i> ATCC 33456	Aérobie et Anaérobie	SHEN et WANG, 1993
<i>Micrococcus roseus</i>	Anaérobie	GVOZDYAK <i>et al.</i> , 1986
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Anaérobie	GVOZDYAK <i>et al.</i> , 1986
<i>Pseudomonas dechromaticans</i>	Anaérobie	ROMANENKO et KORENKOV, 1977
<i>Pseudomonas chromatophila</i>	Anaérobie	LEBEDEVA et LYALIKOVA, 1979
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Aérobie	DHAKEPHALKAR <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas ambigua G-1</i>	Aérobie	HORITSU <i>et al.</i> , 1987
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LB300	Aérobie et Anaérobie	BOPP et EHRLICH, 1988
<i>Pseudomonas putida</i> PRS 2000	Aérobie	ISHIBASHI <i>et al.</i> , 1990

4.2.2. La phytoremédiation

La phytoremédiation repose sur le principe de la combinaison de l'utilisation de plantes et de microorganismes pour réduire les niveaux de ces contaminants. C'est une technologie très coûteuse, mais beaucoup moins destructrice pour le sol que les techniques d'ingénierie. Un taux acceptable de polluants est atteint généralement en moins d'une décennie.

Cependant, cette technique possède des limites : son application est restreinte à des zones où le niveau de pollution n'est pas toxique pour les plantes et contenant les racines des plantes (RUSTY *et al.*, 2014).

Divers types de phytoremédiation existent :

- **La phytodégradation** : la concentration des contaminants est atténuée *in situ* pour des contaminants organiques sans nécessité de récoltes des plantes.
- **La phytoextraction** : les contaminants de type métaux lourds comme le Chrome sont extraits par les plantes qui sont récoltées jusqu'à dépollution du site.
- **La phytostabilisation** : la concentration des contaminants de types organiques ou métalliques est stabilisée par un couvert végétal maintenu *in situ*.
- **La phytovolatilisation** : les contaminants de types organiques ou métalliques sont enlevés par un couvert végétal maintenu.

La figure ci-dessous regroupe les différents types de phytoremédiation.

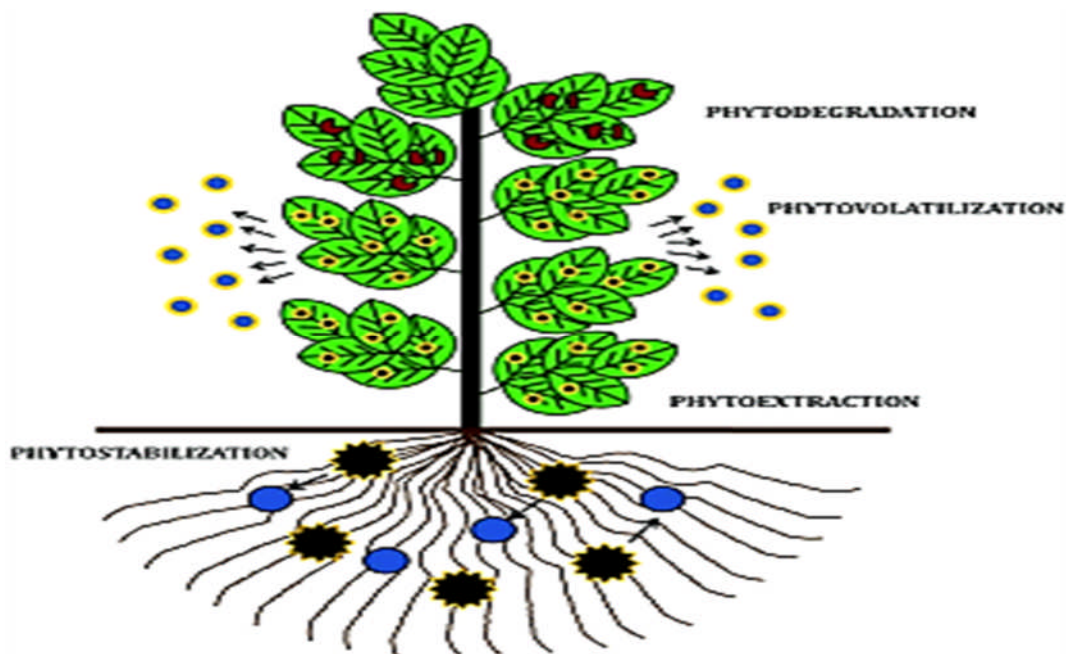


Figure 9 : Les différents types de phytoremédiation (RUSTY *et al.*, 2014).

Dans leur synthèse bibliographique, CERVANTES *et al.* (2001) décrivent le cas de la jacinthe d'eau qui peut accumuler de grandes quantités de chrome.



*Partie
expérimentale*



*Matériel
et
méthodes*

La partie pratique de notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie ainsi qu'au niveau des laboratoires communs I et II d'analyses physico-chimiques de l'université MOULOUD MAMMARI de Tizi-Ouzou, durant la période allant du mois de février au mois de juin de l'année 2016.

À travers ce chapitre nous décrivons les méthodes de caractérisation du sol étudié ainsi que les souches utilisées. En dernier, nous présenterons les tests réalisés pour évaluer l'aptitude de nos souches adaptées à dégrader les phtalates et le chrome dans le sol pollué.

1. Matériel

1.1. Produits chimiques et milieux de culture

Les différents milieux de culture et produits chimiques utilisés sont mentionnés dans le tableau X

Tableau X : Produits chimiques et milieux de culture utilisés

		Référence	Utilisation
Solvants	Acétone	Sigma Aldrich Allemagne	Préparation des solutions polluantes
	Dichlorométhane (CH ₂ Cl ₂)	Sigma Aldrich Allemagne	Extraction des phtalates
Sels	Chlorure de Sodium (NaCl)	Fluka Analytical Allemagne	Préparation de l'eau physiologique
Réactifs	1,5-diphenylcarbazide	Lab. de chimie (UMMTO)	Dosage du Chrome
Substances polluantes	DnOP (Di-n-octyle phthalate)	Lab. physico-chimique de la FSBA de l'UMMTO	Pollution des échantillons de sol
	Chrome VI (K ₂ CrO ₄)		
Milieux de culture (annexe I)	Bouillon cœur-cerveille (BHIB)	Conda Pronadisa Espagne	Revivification des souches bactériennes
	Milieu Luria Bertani (LB)	Institut Pasteur Algérie	Repiquage et dénombrement des souches bactériennes
	Milieu Chapman		Isolement des <i>Staphylococcus aureus</i>
	Milieu King A		Isolement <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Gélose nutritive (GN)		Repiquage des souches bactériennes
	Milieu MSM (mineral salt medium)	Lab. microbiologie (UMMTO)	Adaptation des souches bactériennes aux polluants
	Milieu Sabouraud	Institut Pasteur Algérie	Dénombrement de la flore fongique du sol

1.2. Appareillage

- Spectrophotomètre: Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK).
- Étuve : BINDER. Allemagne.
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne.
- Centrifugeuse : HETTICH UNIVERSAL / K2S.
- Autoclave : WEBECO. Allemagne.
- Four Pasteur : BINDER. Allemagne.
- Bain Marie : MEMMERT. Allemagne.
- Agitateur à barreau magnétique non chauffant : GERHARDT. Allemagne.
- Agitateur à barreau magnétique chauffant : LABINCO L-81. Allemagne.
- Réfrigérateur : ENIEM. Algérie.
- Hotte : KÖTTERMANN. Allemagne.

1.3. Matériel biologique

1.3.1. Le sol

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé un sol prélevé à une profondeur de 20 cm à partir du jardin d'un domicile familial au niveau de la commune de Tizi-Ouzou.

Les caractères de sol ont été étudiés, comme la granulométrie, le pH, l'humidité, taux de carbone organique et conductivité électrique.

1.3.2. Les souches bactériennes utilisées

D'après la littérature, plusieurs types de bactéries Gram-positif ou Gram-négatif isolés de différents environnements (boues activées, sol, ...etc) peuvent dégrader les phtalates, tels que *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Bacillus sp.* et *Sphingomonas sp.* (CHANG *et al.*, 2004;. LIANG *et al.*, 2008 ; STASINAKIS, 2012 ; WU *et al.*, 2013, ZENG *et al.*, 2002; NAKAMIYA. *et al.*, 2005; QUAN *et al.*, 2005).

À cet effet nous avons étudié la capacité de certaines souches à dégrader des isomères de phtalates et à réduire le chrome hexavalent comme *Pseudomonas aeruginosa* selon VAMSEE (2006) et GVOZDYAK *et al.* (1986), *Bacillus cereus* d'après YUAN *et al.* (2004) ; CHANG *et al.* (2004, 2005) et GVOZDYAK *et al.* (1986). Enfin, nous avons choisi *Staphylococcus aureus* d'après les études de. JAYANTHI M. *et al.* (2013) et GOGRA A. B. *et al.* (2010).

Ces souches de référence procurées par le laboratoire de microbiologie de l'UMMTO, qui sont *Staphylococcus aureus* ATCC43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Bacillus cereus* ATCC10876 serviront à tester leurs aptitudes à dégrader les phtalates et le chrome dans un sol artificiellement pollué par ces derniers.

Différents tests ont été effectués afin de vérifier leur pureté comme la coloration de Gram, la catalase, l'oxydase, la coagulase et la sporulation.

Concernant la culture de ces souches, des milieux sélectifs et non sélectifs ont été utilisés comme le milieu Chapman pour *Staphylococcus aureus* ATCC43300, le milieu King A pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et le milieu gélosé Luria Bertani pour *Bacillus cereus* ATCC27853.

2. Méthodes

2.1. Caractérisation du sol

Les différents paramètres du sol utilisé ont été étudiés afin de connaître leurs effets sur la biodégradation des polluants.

2.1.1. Analyse physico-chimique du sol

2.1.1.1. Analyse granulométrique

Elle a pour but de déterminer le pourcentage des différentes fractions de particules constituant les agrégats de sol qui peuvent être classées selon la classification d'ATTERBERG adoptée par l'association internationale de la science du sol (BAIZE, 2000).

La figure 10 schématise cette classification.

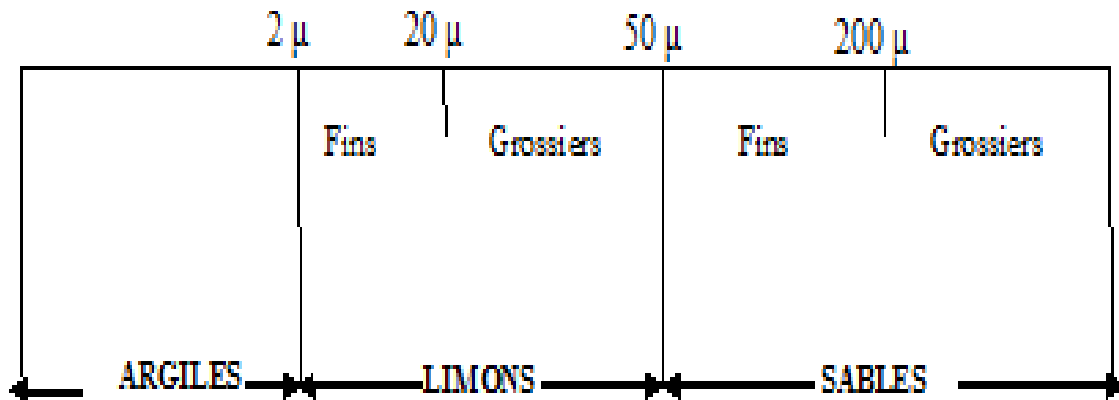


Figure 10 : Schéma représentatif de la classification des fractions de sol selon ATTERBERG (BAIZE, 1988)

L'analyse granulométrique a été effectuée sur une prise d'essai de terre fine ($\phi < 2$ mm), basée sur la méthode internationale de la pipette de ROBINSON (AUBERT, 1982 ; BAIZE, 2000).

Le principe de cette méthode consiste à :

- Détruire la matière organique par une attaque à l'eau oxygénée ;
- Disperser les particules par un dispersant énergétique l'hexametaphosphate de sodium et par agitation mécanique ;
- Effectuer des prélèvements à l'aide de la pipette de ROBINSON, dans des flacons à sédimentation à des profondeurs et à des moments déterminés en appliquant la loi de Stokes (détails en annexe III).

2.1.1.2. L'humidité du sol

La teneur pondérale en eau du sol a été déterminée par la méthode gravimétrique selon la norme NF ISO 1146. Le taux d'humidité exprimé en % (masse d'eau dans 100 g de sol) est obtenu selon la formule suivante

$$\% H = (m_1 - m_0) / m_0$$

Avec :

m_0 : poids de la prise d'essai du sol avant séchage (g) ;

m_1 : poids de la prise d'essai du sol après séchage à 105°C (g) ;

% H : pourcentage de l'humidité.

2.1.1.3. Potentiel d'hydrogène (pH)

La détermination des pH à l'eau est d'intérêt car elle révèle l'acidité potentielle ou l'activité d'échange du sol (BONNEAU et SOUCHIER, 1994).

Le pH des échantillons du sol a été déterminé selon la norme AFNOR X 31-103 (AFNOR, 1994). Le sol est mis en suspension dans de l'eau distillée dans un rapport 2/5 (masse/volume) et soumis à une agitation pendant 60 minutes à une température proche de 20°C. Après 2h de décantation, la lecture au pH-mètre de type INOLAB est faite après stabilisation

2.1.1.4. Conductivité électrique

Elle a été déterminée par un conductimètre de type PHYWE selon la norme (NF X 31-113), celle-ci repose sur l'extraction des sels d'un échantillon de terre, solubles dans l'eau, dans des conditions bien définies et dans un rapport 1/5 (AFNOR, 1987).

2.1.1.5. Évaluation de taux de carbone organique

Le dosage se fait par la méthode de « ANNE », selon (HENIN et *al*, 1969) le principe de cette manipulation repose sur l'oxydation du carbone organique en CO₂ par un mélange de bichromate de potassium et l'acide sulfurique à chaud ; l'excès de bichromate est titré à froid par une solution de sel de Mohr.

Nous avons introduit 2g de sol (fraction fine) dans les ballons de 250 mL avec 10 mL de la solution de bichromate de potassium à 8% et 15 mL d'acide sulfurique concentré. Puis les ballons sont portés à ébullition douce pendant 5 mn.

Après refroidissement, la solution est transvasée dans une fiole de 250 mL et ajusté avec les eaux de rinçage. Une aliquote de 20 mL a été prélevée additionnée de 200 mL d'eau distillée, d'une pincée de fluorure de sodium (NAF) et de 4 à 5 gouttes de diphénylamine.

- Le bichromate en excès a été titré à froid à l'aide d'une solution réductrice de sel de Mohr.
- Le dosage du témoin donne un volume du témoin (V_T) de solution réduite (sel de Mohr).
- Le dosage de l'échantillon donne volume de l'essai (V_E) de solution réduite (sel de Mohr).

La teneur en carbone organique pour 100g de sol est donnée par la formule suivante :

$$\% C = \frac{(V_T - V_E) \cdot 0,615 \cdot 10 \cdot 100}{p}$$

Avec :

% C : pourcentage de carbone organique (%).

V_T : volume du témoin (mL).

V_E : volume de l'essai (mL).

p : prise d'essai (g).

2.1.1.6. Évaluation du taux de la matière organique

On admet que le carbone représente 58% de la matière organique totale. Le pourcentage de la matière organique peut être donc exprimé par la formule suivante :

$$\% \text{ MO} = 1,72 \cdot \text{C}\%$$

Avec :

% MO : pourcentage de la matière organique du sol ;

% C : pourcentage de carbone organique.

2.1.2. Dénombrement de la microflore du sol

Un dénombrement de la microflore bactérienne et fongique a été effectué dans le but de connaître l'impact de cette dernière sur la biodégradation des polluants ainsi que sur les différents inocula.

Afin de dénombrer la microflore bactérienne présente dans notre échantillon, nous avons procédé à une culture sur gélose LURIA BERTANI (LB), pour cela, une série de dilution décimale variant de 10^{-1} à 10^{-9} a été effectuée (figure 11). Après 18h à 24h d'incubation à 30°C, les colonies obtenues sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies de type FUNKE GERBER.

Pour le dénombrement de la flore fongique, nous avons procédé à une culture sur milieu Sabouraud à 25°C, pendant 3 à 5 jours.

Selon MARCHAL et BOURDON (1982), le nombre de germes est déterminé en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus et en tenant compte des facteurs de dilution, selon la formule :

$$N = (n / d) \cdot v$$

Avec :

N : Nombre des microorganismes en UFC/mL ;

n : Nombre des colonies dénombrées ;

v : Volume prélevé (mL) ;

d : Dilution.

La figure suivante montre les différentes étapes du dénombrement de la flore totale du sol.

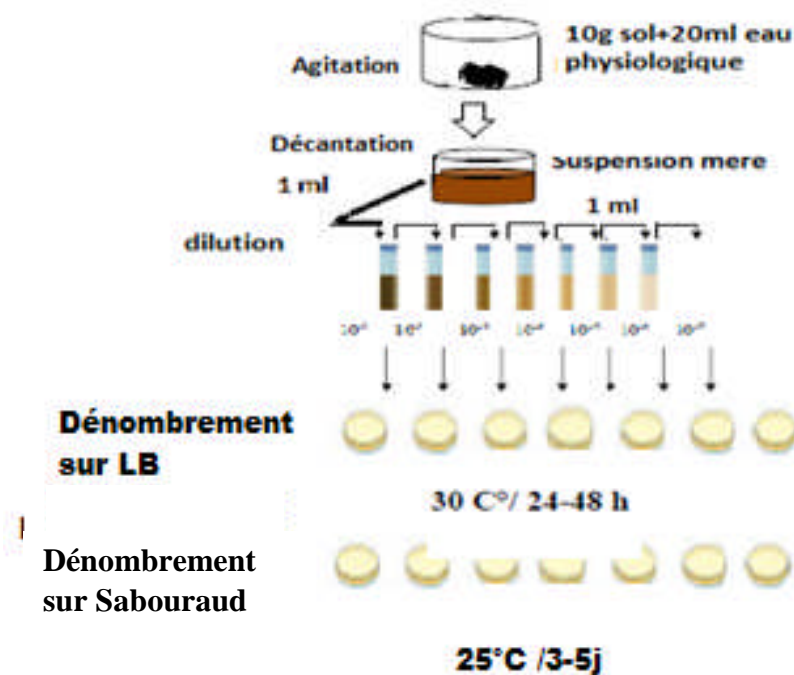


Figure 11 : Schéma de la méthode de dénombrement de la flore totale du sol.

2.2. Vérification de la pureté des souches

En premier lieu, nous avons procédé à la vérification de la pureté des souches reçues du laboratoire de microbiologie de l'UMMTO ; celle-ci a été réalisée en se basant sur quelques tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

2.2.1. Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après JOFFIN et LEYRAL (2006), les critères d'identifications macroscopiques sont :

- **La forme des colonies** : rondes, irrégulières, ovale, dentelée ;
- **La chromogènes** : couleur de la colonie ;
- **L'élévation** : convexe, concave, plate ;
- **L'opacité** : opaque, translucide ou transparente ;
- **La surface** : lisse, rugueuse, sèche, dentelée ;
- **La consistance** : visqueuse, crémeuse ;

Cette observation s'est faite à la loupe binoculaire au grossissement x 40.

2.2.2. Aspect microscopique

2.2.2.1. Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (MARCHAL et BOURDON, 1982)

2.2.2.1.1. Préparation de l'échantillon

– Étalement

Déposer une colonie bactérienne sur une lame en verre préalablement dégraissée qui contient une goutte, étalée en une couche mince et homogène.

– Séchage

Faire passer le frottis au-dessus de la flamme.

– Fixation

Le frottis est fixé par la chaleur par le passage 4 à 5 fois dans la flamme.

2.2.2.1.2. Coloration du frottis

- Recouvrir le frottis avec le violet de gentiane qu'on laisse agir 1 mn ;
- Rejeter le colorant et recouvrir avec le lugol qu'on laisse agir 1mn ;
- Décolorer à l'alcool pendant 30 secondes ;
- Rincer à l'eau courante pour neutraliser l'action de l'alcool ;
- Recouvrir le frottis avec de la fushine et laisser agir 1mn ;

- Lavage à l'eau ;
- Sécher et observer à l'immersion (Gx1000) ;

➤ **Lecture**

- Les bactéries Gram+ apparaissent en rose.
- Les bactéries Gram-apparaissent en violet.

2.2.2.2. Recherche de spores

La coloration au vert de Malachite permet, en plus de l'observation de la morphologie cellulaire, de déterminer la présence ou l'absence de spores (DELARRAS, 2008).

Elle se fait selon les étapes suivantes :

- Fixer le frottis à la flamme. Traiter avec le vert de malachite pendant 1n chauffant jusqu'à émission de vapeurs ;
- Laver à l'eau courante ;
- Recouvrir avec la safranine pendant 5 mn ;
- Laver à l'eau courante ;
- Sécher et l'observer à l'immersion au grossissement X 1000.

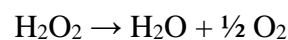
Les spores sont colorées en vert et le corps bactérien en rouge.

2.2.3. Tests biochimiques

Les tests biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (TORTORA *et al.*, 2003).

2.2.3.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. La fonction principale de la catalase dans les cellules est de prévenir l'accumulation de niveaux toxiques de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) formé comme sous-produit de processus métaboliques. Elle catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène qui se dégage selon :



Le test consiste à mettre en contact sur une lame une goutte d'eau oxygénée avec un fragment d'une colonie bactérienne.

La lecture se fait instantanément avec l'apparition d'un dégagement gazeux sous forme de bulles qui révèle une catalase positive.

2.2.3.2. Recherche de l'oxydase

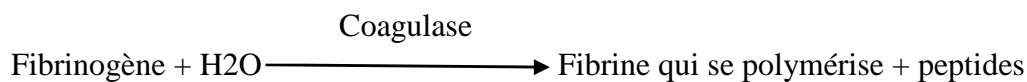
C'est une enzyme de la chaîne respiratoire fonctionnant avec le cytochrome C ; Pour sa mise en évidence, un disque imprégné d'oxalate de diméthyle paraphénylene diamine est mis dans une suspension d'eau physiologique (MARCHAL ET BOURDON, 1982).

L'apparition immédiate d'une coloration violette indique que la souche est oxydase positive.

2.2.3.3. Recherche de la coagulase

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie (PHILLIPS et KLOOS, 1981).

La coagulase libre est une enzyme capable de coaguler le plasma de lapin, recueilli sur anticoagulant, *in vitro*.



➤ Principe

- Dans un tube à hémolyse, déposer :
 - 4 gouttes de plasma humain ;
 - 4 gouttes de culture en bouillon coagulase, agité ;
- Placer le tube à hémolyse au bain-marie à 37°C ou à l'étuve à 37°C.
- Observer à partir de 30 minutes et jusqu'à 24 heures.

La prise en masse du contenu du tube et la coagulation du plasma indique que la souche est coagulase libre + (Orientation vers *Staphylococcus aureus*).

2.3. Conservation des souches purifiées

Afin de conserver les souches purifiées, celles-ci sontensemencées par la méthode des stries sur gélose nutritive inclinée en tubes. Après incubation à 37°C pendant 18h à 24h, les tubes dans lesquels il y a eu une croissance sont bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 1 semaine, en faisant des repiquages successifs afin de garder ces souches viable le plus longtemps possible (MARCHAL et BOURDON, 1982).

2.4. Méthodologie de bioremédiation

L'activité microbienne est le principal mécanisme responsable de la dégradation des esters de phtalates dans le sol et les sédiments, elle est plus efficace en conditions d'aérobie que d'anaérobie (YUAN *et al.*, 2002). Ceci s'applique aussi au chrome d'après DESJARDIN (2002). Afin d'étudier le processus de bioremédiation des polluants, nous avons procédé comme suit :

- Préparation des échantillons de sol et les substances polluantes ;
- Pollution des échantillons de sol préparés
- Adaptation des souches bactériennes aux polluants ;
- Préparation des inocula ;
- Bioaugmentation des échantillons de sol.

Pour cela, nous avons testé l'aptitude de ces souches bactériennes à la biodégradation des phtalates et du chrome dans le sol.

Ce test est réalisé après une adaptation dans un milieu artificiel (milieu de culture (MSM) constitué uniquement de minéraux additionné du polluant qui serait la seule source de carbone..

Nous avons aussi étudié l'impact de différents paramètres influençant la dégradation du DnOP présent dans le sol par les souches adaptées. Nous avons varié certains paramètres tels que le type de l'inoculum et la présence d'autres polluants (WANG, 2009)

En plus des tests de bioremédiation réalisés avec des inocula préparés uniquement avec la culture d'une seule souche bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus cereus* ATCC10876 ou *Staphylococcus aureus* ATCC43300), nous avons évalué l'effet de la combinaison des deux souches *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC43300 sur l'évolution du taux de biodégradation.

Nous avons aussi évalué la possibilité d'une dégradation du DnOP par des réactions chimiques telles que l'oxydation et l'hydrolyse, une expérience de contrôle stérile a été réalisée par passage à l'autoclave dans un milieu mixte d'esters d'acide phtaliques (EAP) pendant 25 min à 121°C. Une faible dégradation a été observée ce qui suggère que la perte abiotique des EAP peut être négligée au cours de cette étude (ZENG, 2003).

L'humidité du sol était ajustée par pesée et addition d'eau distillée stérile en cas de besoin. L'aération du sol était assurée par agitation manuelle de manière hebdomadaire pendant toute la période d'essai

En fin de traitement il a été effectué une estimation des différents paramètres notamment le pH, le taux d'élimination des polluants ainsi que la flore bactérienne évaluée par simple dénombrement sur gélose LB.

2.4.1. Préparation des échantillons du sol

Le prélèvement du sol a été réalisé à une profondeur de 20 cm. Les échantillons du sol réceptionnés au niveau du laboratoire ont été séchés à l'air libre pendant 48 heures et tamisés à 5 mm puis à 2 mm de diamètre afin d'éliminer les éléments grossiers et les débris organiques.

Le sol a été réparti en vingt échantillons de 100g, dont certains sont stériles et d'autres non stériles. Ils ont été conditionnés dans des flacons en verre stériles et non stériles.

La méthode de préparation des échantillons a été détaillée comme suit

2.4.1.1.Sol pollué non stérile (SNS)

Pour la préparation des échantillons de sol pollué par le DnOP et le Chrome nous nous sommes référés à la méthode utilisée par WANG (2009).

Le sol a été réparti en dix échantillons, dont cinq sont pollués par le DnOP et les cinq autres par le DnOP + Cr VI.

La pollution avec le DnOP s'est faite après l'avoir dissout dans de l'acétone puis dans l'eau pour une concentration finale en DnOP de 1,0 g /kg de sol sec.

L'addition du Chrome s'est faite à travers l'ajout de K_2CrO_4 dissout dans l'eau pour obtenir une concentration finale de 1.8g de Cr/kg de sol.

Après avoir soigneusement mélangé avec une spatule en acier inoxydable, les pots de sol sont exposés à l'air libre pendant 24 heures afin de permettre l'évaporation de l'Acétone.

2.4.1.2. Sol pollué stérile (Sol st)

Dans le but de préparer ces échantillons, le sol est réparti dans des flacons puis stérilisé par autoclavage (20 mn à 120°C,) trois fois successives avec des intervalles de temps de 24 heures pour éliminer la flore du sol (OTTON *et al.*, 1994). Le polluant a été introduit à travers un filtre d'un diamètre (\varnothing) de 0.45 μ .

2.4.1.3. Sol témoin

Ce sont des échantillons de sol stérile et non stérile, pollués par le DnOP ainsi que par le DnOP + Cr VI non inoculés par nos souches bactériennes.

Les échantillons de sol stérile non inoculés ont été utilisés comme témoins pour mesurer toute dégradation ou perte de produits chimiques qui n'est pas due à une dégradation microbienne. Quant aux échantillons de sol non stérile, ont été utilisés comme témoins pour mesurer toute dégradation des polluants due à la microflore du sol (OTTON *et al.*, 1994).

2.4.2. Adaptation des souches à la pollution

L'adaptation des souches bactériennes aux deux polluants (DnOP et Cr VI) s'effectue comme suite :

- Lancer une culture sur bouillon nutritif liquide (BHIB) des souches conservées sur GN ;
- Incuber les cultures à 37°C pendant 24 heures, la poussée se manifeste soit par un trouble. À partir de ces cultures, faire une centrifugation à 3000 t/mn pendant 10 minutes ;
- Récupérer les culots après avoir effectué trois lavages successifs pour s'assurer de l'élimination complète du milieu de culture ;
- À partir des culots récupérés, ensemercer dans des tubes de MSM de concentration faible de polluant (voir figure 12). Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures sous agitation ;
- Prélever 1 ml de la suspension bactérienne des tubes précédents puis ensemercer dans des tubes MSM à concentration plus élevée du polluant. Répéter avec différentes concentrations du polluant (DnOP : C1= 100 mg/L ; C2= 250 mg/L ; C3= 500 mg/L ; C4=1000 mg/L. /Cr VI : C1= 200 mg/L ; C2= 500 mg/L ; C3= 1000 mg/L ; C4=1800 mg/L) ;
- À partir de la dernière culture de MSM ensemercer sur tubes de GN inclinée, incuber à 37°C pendant 24 heures puis les conserver à 4°C.

La figure 12 schématise le procédé d'adaptation des souches bactériennes aux polluants dans un milieu liquide.

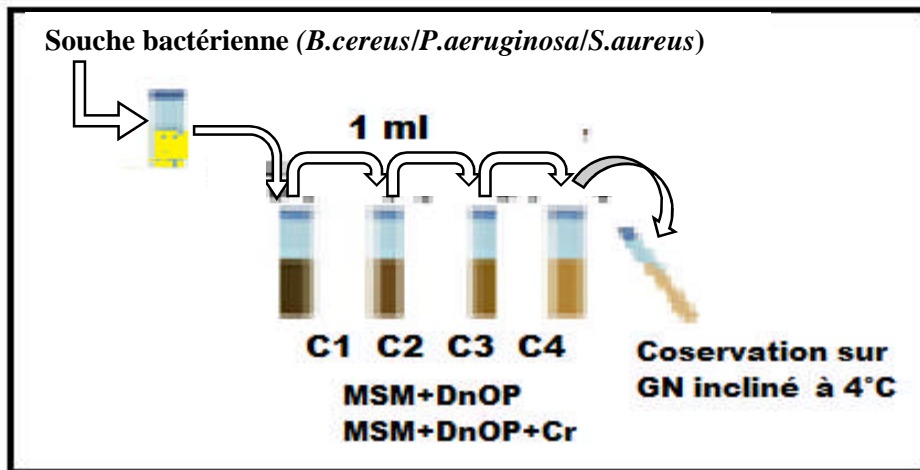


Figure 12 : Procédé d'adaptation des souches bactériennes sur milieu liquide pollué.

2.4.2.1. Préparation de l'inoculum

L'inoculum utilisé lors de la bioremédiation du sol pollué est une culture bactérienne à base de souches appartenant respectivement aux genres *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp* et *Pseudomonas sp*. La préparation de l'inoculum consiste à un pré-enrichissement sur bouillon BHIB à 37°C pendant 18 à 20 heures, des souches adaptées et conservées sur milieu gélose nutritive (GN).

Nous avons effectué des repiquages sur MSM puis sur LB, ceci jusqu'à obtention d'une biomasse bactérienne ayant une densité optique (DO) égale à 0,9 à une longueur d'ondes de 620 nm.

2.4.2.2. Sol bioaugmenté

Il correspond aux échantillons de sol pollué stérile (SPst) et non stérile (SP) auxquels on a ajouté un inoculum de différentes souches bactériennes dans des conditions stériles :

- Des échantillons de sol pollué (Sol st et SNS) bioaugmentés par un inoculum d'une souche bactérienne de *Bacillus cereus* ATCC10876 ;
- Des échantillons de sol pollué (Sol st et SNS) bioaugmentés par un inoculum d'une souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ;
- Des échantillons de sol pollué (Sol st et SNS) bioaugmentés par un inoculum d'une souche bactérienne *Staphylococcus aureus* ATCC43300 ;
- Des échantillons de sol pollué (Sol st et SNS) bioaugmentés par un inoculum d'un consortia *Staphylococcus aureus* ATCC43300 et *Bacillus cereus* ATCC10876.

La figure 13 caractérise les différentes étapes de bioremédiation d'un sol pollué.

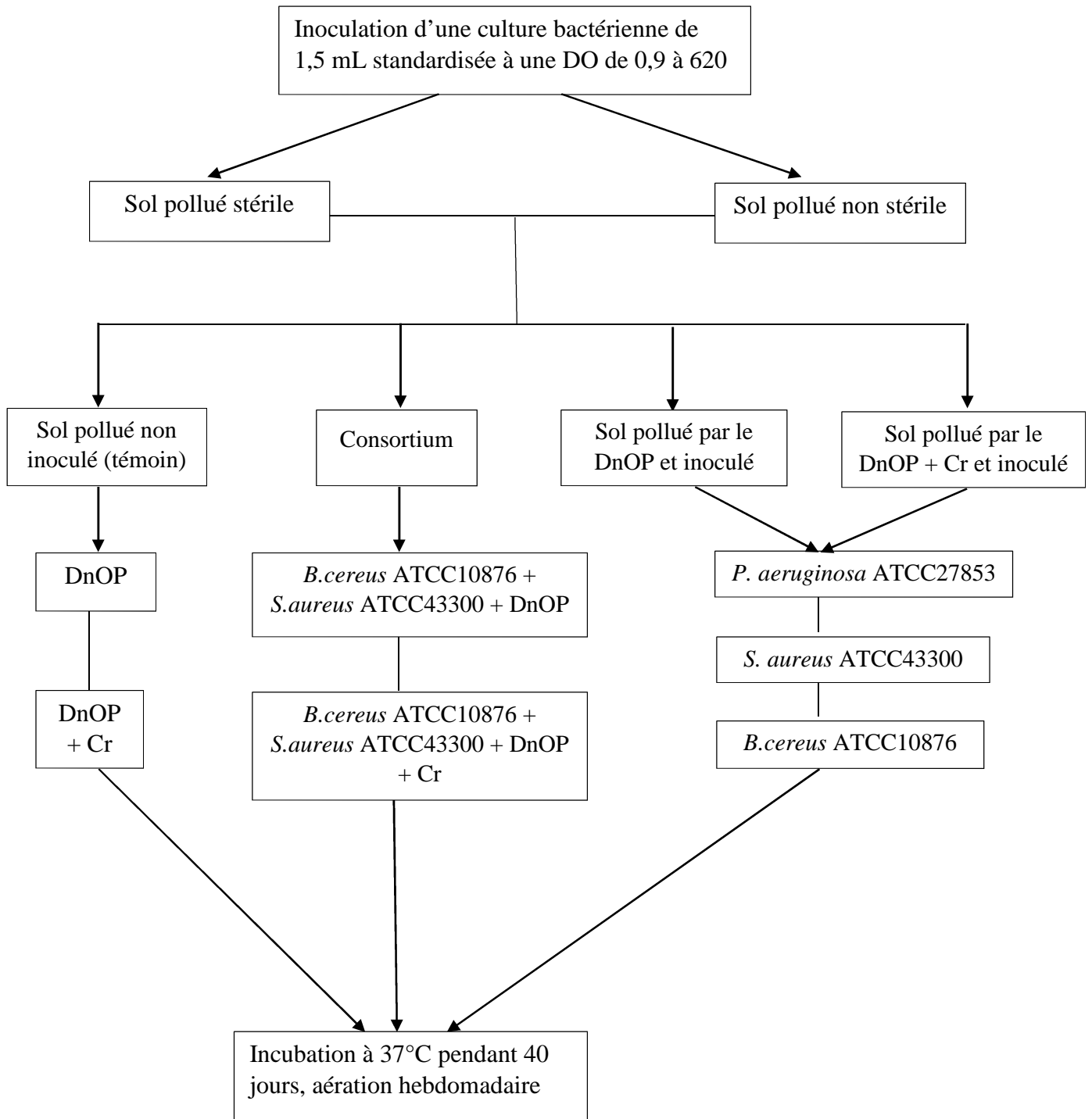


Figure 13 : Procédé de bioremédiation du sol pollué par le DnOP et le Cr VI (WANG, 2009).

2.4.3. Dosage des polluants

2.4.3.1. Extraction et analyse du DnOP

L'extraction de DnOP a été effectuée selon la méthode d'extraction solide-liquide citée par XINHONG (2009).

Cette méthode consiste à mettre un échantillon de sol (10 g) avec 20 mL de dichlorométhane en agitation pendant 30 min à 200 tr/min, ensuite l'extrait est recueilli après centrifugation. Le processus est répété deux fois.

Les extraits recueillis sont mélangés dans le même bécher et soumis à évaporation sous la hotte. Enfin, le dépôt du polluant organique a été pesé.

Le poids du DnOP est donné selon la formule suivante :

$$m \text{ DnOP} = m_1 - m_0$$

Avec :

m DnOP : Poids du DnOP

m_0 : Poids du bécher vide

m_1 : Poids du dépôt après évaporation

Une autre pourrait être utilisée pour l'extraction et l'analyse du DnOP, qui est de soumettre les échantillons de sol pollués à l'infra-rouge (IR).

La figure suivante résume les différentes étapes de l'extraction du DnOP.

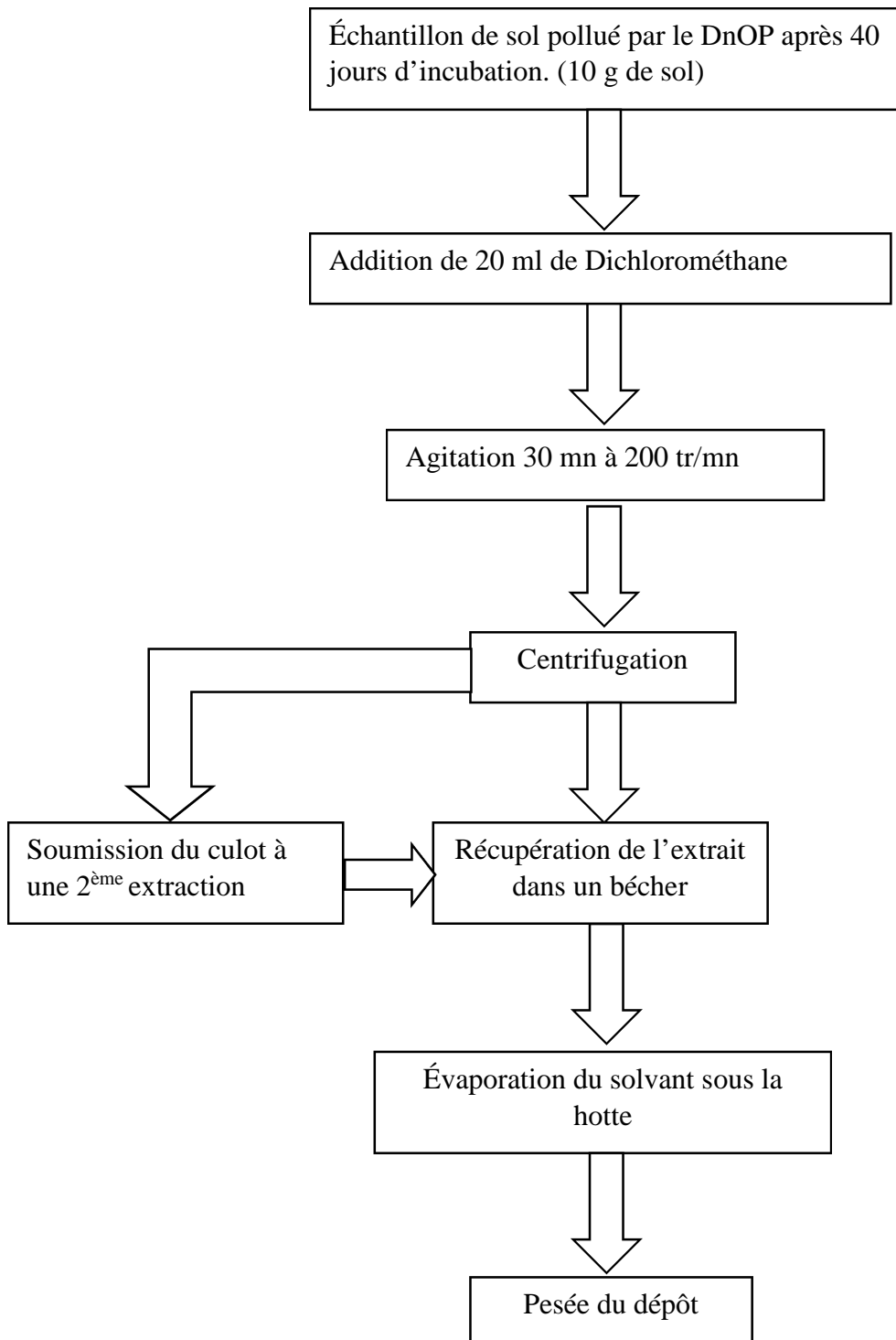


Figure 14 : Protocole d'extraction du DnOP (WANG, 2009).

2.4.3.2. Dosage du chrome

La méthode usuelle de détermination du chrome est la méthode du Diphénylcarbazine. Cette méthode est considérée comme la plus sensible et la plus sélective par rapport à d'autres méthodes comme celle du chromate et d'EDTA (voir annexe V).

Dans un milieu acide le diphénylcarbazine réagit avec le chrome (VI) donnant un complexe violet qui est la base de cette méthode. On peut aussi l'appliquer pour déterminer le chrome (III) après son oxydation dans un milieu acide par un agent oxydant ($K_2S_2O_8$, H_2O_2 ,...).

Sachant que l'absorbance de la solution varie avec l'acidité du milieu, il faut que le pH soit aux environs de 1 (le pH optimum) par l'addition de l'acide sulfurique (0.05–0.1M) (DESJARDIN, 2002).

La limite de détection de cette méthode est de 0.8 mg/l (CEAE du Québec, 2010)

2.4.4. Analyse de l'activité enzymatique

D'après WANG (2009), l'activité de la catalase est considérée comme un bio-indicateur de la pollution du sol. Elle a été étudiée afin de déterminer l'impact des polluants sur l'activité microbienne.

La méthode d'estimation de l'activité de la catalase, est basée sur la mesure du taux de disparition H_2O_2 comme décrit par LEE *et al.* (2007).

Un échantillon de sol séché à l'air (2 g) a été mélangé avec 10 ml d'eau distillée et 5 ml de H_2O_2 0,3%. Après agitation pendant 20 min, 5 ml de H_2SO_4 à 1.5 M a été introduit pour terminer la réaction. Le mélange a été ensuite filtré et le filtrat a été titré avec du $KMnO_4$ à 0,02 M.



*Résultats
et
discussion*

1. Caractéristiques du sol

Nous avons procédé à un tamisage du sol (2 mm), après séchage des échantillons prélevés sur un site non pollué par des déchets plastiques ou métalliques. La fraction supérieure constituée de cailloux et graviers, n'est ni un réservoir de pollution ni de nutriments.

La fraction inférieure à 2 mm est celle communément utilisée dans la littérature pour la caractérisation physico-chimique, microbiologique et la biodégradation des polluants dans le sol. Des pertes biotiques et abiotiques du sol pollué ont été prises en considération.

1.1. Caractéristiques physico-chimiques du sol

D'après les analyses effectuées sur ce sol, les principales propriétés ont été répertoriées dans le tableau suivant :

Tableau XI : Caractéristiques du sol étudié.

Caractéristiques	Valeurs
Humidité (%)	22,52 %
pH	7,23
Conductivité ($\mu\text{s}/\mu\text{mho}$)	$34,28.10^3$
Granulométrie (%)	Argile : 59,71%, Limons : 34,02%, Sable : 6,27%
C (%)	2,4%
MO (%)	4,128 %
Microflore bactérienne (UFC/g sol)	2.10^8
Microflore fongique (UFC/g sol)	40

1.1.1. Granulométrie

L'analyse granulométrique montre une prédominance de la fraction argile (59,71%), dans notre échantillon de sol.

Selon DOVET (1996), la fraction d'argile est une source d'éléments nutritifs, assurant aux microorganismes du sol la disponibilité des nutriments et de l'eau. La bonne proportion en argile dans notre sol affecterait donc positivement l'activité microbienne.

1.1.2. Humidité

Les échantillons de sol étudiés sont caractérisés par une humidité relative de 22,52 %. Selon DAVIS et MADSEN (1996), ainsi que BALLERINI (1999), des taux d'humidité de sol inférieurs à 2% limitent la croissance microbienne et les vitesses de biodégradation. On peut dire donc que pour notre sol l'humidité ne sera pas un facteur limitant.

1.1.3. Conductivité électrique et pH du sol

Les échantillons de notre sol sont caractérisés par une conductivité électrique d'ordre de $34.28.10^3 \mu\text{s}/\mu\text{mho}$.

La mesure du pH de l'eau (pH_{eau}) met en évidence l'activité des ions H_3O^+ présents dans le surnageant de la phase aqueuse. Dans notre cas, le pH est de 7,18, qui est dans la marge optimale et favorable à la biodégradation des polluants selon plusieurs auteurs (LECOMPTE, 1995 ; BATTLE et NFESC, 1996 ; BALLERINI, 1999 ; COMEAU, 1999).

D'après GABET (2004), l'activité microbienne est très affectée par le pH, il doit être compris entre 5 et 9. En outre, le pH recommandé pour une biodégradation optimale se situe entre 7 et 8 qui favoriserait la croissance des bactéries et des champignons (LEAHY et COTWELL, 1990 ; THOMAS et LESTER, 1993).

Dans le cas de notre sol un ajustement de pH n'est pas nécessaire, par conséquent la mise en place des procédés de bioremédiation est possible.

1.1.4. Éléments carbonés

Les taux de carbone et de matière organique présents dans nos échantillons de sol pollué sont de 2,4 % et de 4,128 % qui permettraient la croissance des microorganismes présents dans le sol.

1.2. Analyses microbiologiques du sol

1.2.1. Dénombrement de la microflore bactérienne

Les résultats obtenus pour le dénombrement des colonies bactériennes sur gélose LB est de l'ordre de 2.10^8 UFC/g et de 40 UFC/g pour la microflore fongique, elle est de Cette teneur est satisfaisante, on peut donc s'attendre à une bonne dégradation des polluants.

En effet le sol étudié présente une flore autochtone satisfaisante, vu que la norme exige une teneur supérieure ou égale à 10^6 germes/g de sol (BATTELE et NFESC, 1996). Nos résultats nous permettent d'avancer que ce sol pourrait être traité par des procédés biologiques en utilisant sa propre flore microbienne dite « flore indigène».

Plusieurs auteurs ont débuté des traitements avec un nombre initial en microorganismes dépassant 10^6 germes /g de sol, c'est le cas de STAPLETON *et al.*, (1998), ERIKSSON *et al.*, (2001) et MARGESIN et SCHINNER (2001), qui ont travaillé avec un nombre de germes initial, respectivement, de $6.5 \cdot 10^7$ UFC/g de sol, de $2.3 \cdot 10^7$ UFC/g de sol et de $1.1 \cdot 10^6$ UFC/g de sol.

1.3. Vérification de la pureté des souches bactériennes utilisées

Les résultats obtenus des différentes techniques appliquées sur nos souches bactériennes, ont permis de confirmer la pureté de ces dernières énumérées dans le tableau suivant :

Tableau XII : Caractères morphologiques et biochimiques des souches utilisées

Souches	Aspect macroscopique	Gram	Arrangement	Présence de spores	Catalase	Oxydase	Coagulase
<i>Bacillus cereus</i> ATCC10876	Colonies rondes, blanches, opaques, brillantes, contours irréguliers, convexes.	(+)	Longs bacilles à courtes chaînes	Endospore ovale non déformante	(+)	(-)	(-)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Grandes colonies isolées, bombées à contour irrégulier et production de Pyocyanine	(-)	Petits bacilles isolés ou en diplo bacilles	(-)	(+)	(+)	(-)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	Colonies lisses, rondes, bombées, opaques, pigmentées en jaune	(+)	Cocci groupés en amas	(-)	(+)	(-)	(+)

La figure 15 montre l'aspect microscopique des différentes souches bactériennes utilisées

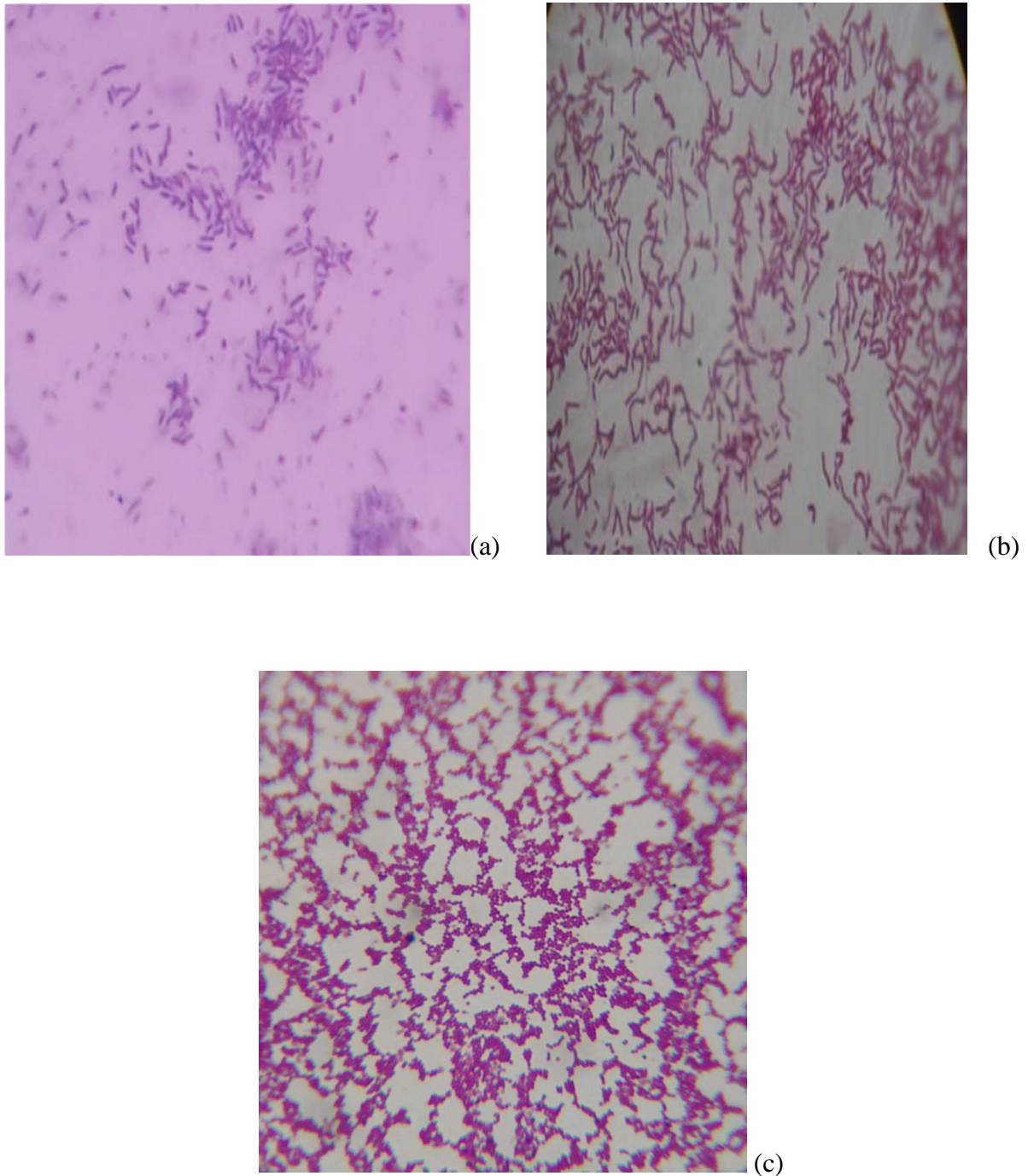


Figure 15 : Aspect microscopiques des souches bactériennes observé au microscope optique (GX1000) ; (a : *Pseudomonas aeruginosa* ; b : *Bacillus cereus* ; c : *Staphylococcus aureus*)

2. Tests de biodégradation

Afin d'estimer la capacité de certaines souches à dégrader le DnOP et le Cr VI après une étape d'adaptation, nous avons procédé à des tests de biodégradation par bio-augmentation de sol pollué artificiellement.

2.1. Étude de la biodégradation dans le sol (microcosme)

Nous avons étudié l'impact de certains paramètres comme le pH, la nature du polluant et de l'inoculum sur la dégradation du DnOP et la réduction du Cr VI.

2.1.1. Analyse de l'évolution du pH

2.1.1.1. Effet du pH sur la flore indigène du sol

Les résultats obtenus de l'évolution du pH dans un sol pollué (stérile et non stérile) non inoculé sont schématisés dans la figure 16.

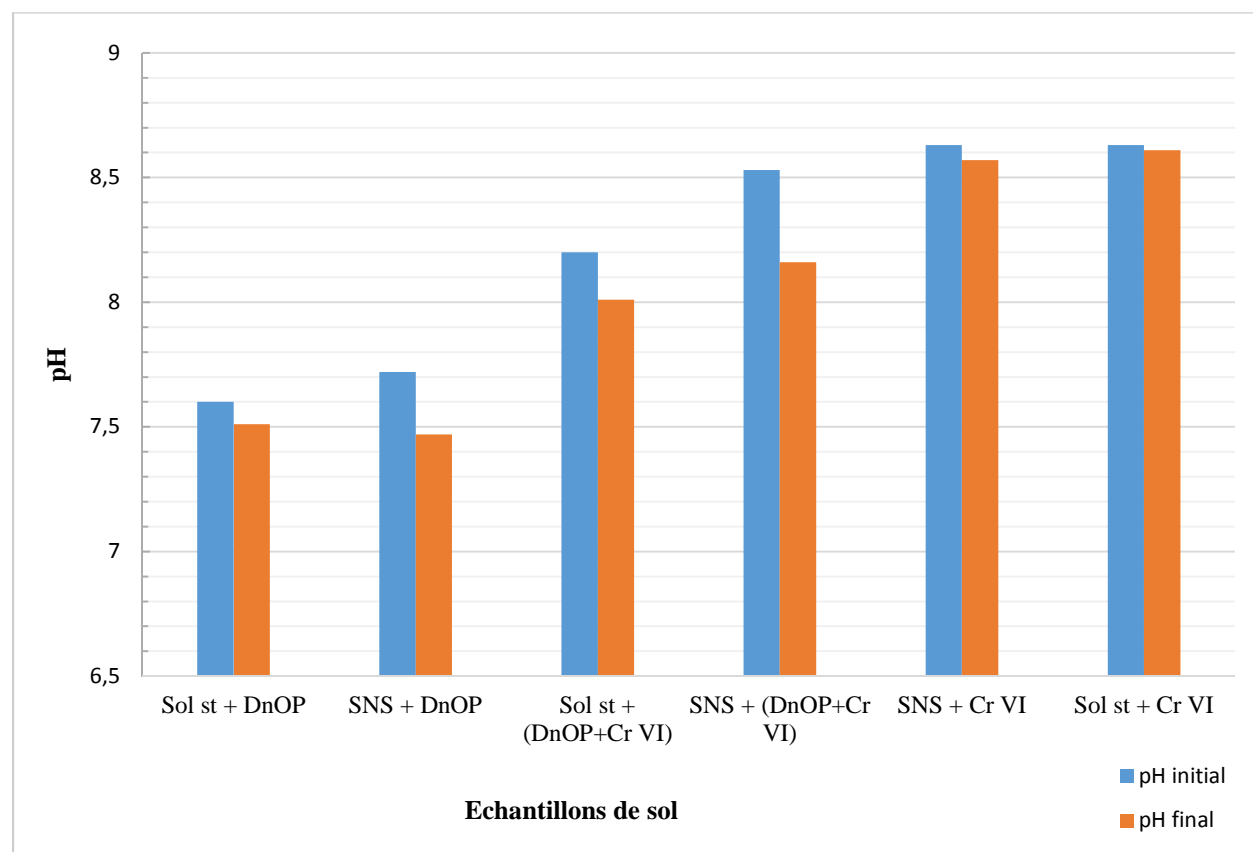


Figure 16 : Effet de l'évolution du pH sur la flore indigène dans les échantillons de sol pollué.

Afin d'étudier l'impact du pH sur la flore indigène dans les microcosmes de sol pollué stérile et non stérile, le pH a été mesuré en conditions initiales et finales (avant et après incubation).

En premier lieu, on constate que le chrome étant de nature alcaline ($\text{pH}_{\text{initial}} = 8,63$) a tendance à augmenter le pH du sol, par conséquent, le sol pollué avec le DnOP associé au chrome présente un pH plus élevé que le sol pollué uniquement avec le DnOP.

On remarque aussi, une légère baisse du pH après incubation pour le sol pollué non stérile, qui serait due à une libération d'acide phtalique suite à la dégradation des phtalates par la flore indigène (FANG *et al.*, 2010). Ce dernier explique aussi que les intermédiaires de dégradation de DBP accumulés dans le milieu de culture abaissent le pH.

Les trois tests de l'ANOVA pour les échantillons de sol pollués par le DnOP ainsi par le DnOP + Cr VI, ont donné une p-value $> 0,05$, donc n'il n'y'a pas une différence significative entre les échantillons. Le pH n'aurait pas d'impact sur la flore indigène.

D'après la figure 16, On remarque aussi, que durant l'incubation des microcosmes pendant 40 jours, le pH se situe entre 7,47 et 8,53, restant toujours favorables à la croissance bactérienne (COMEAU, 1999).

2.1.1.2. Évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par le DnOP

La figure suivante représente l'évolution du pH des échantillons de sol pollués par le DnOP.

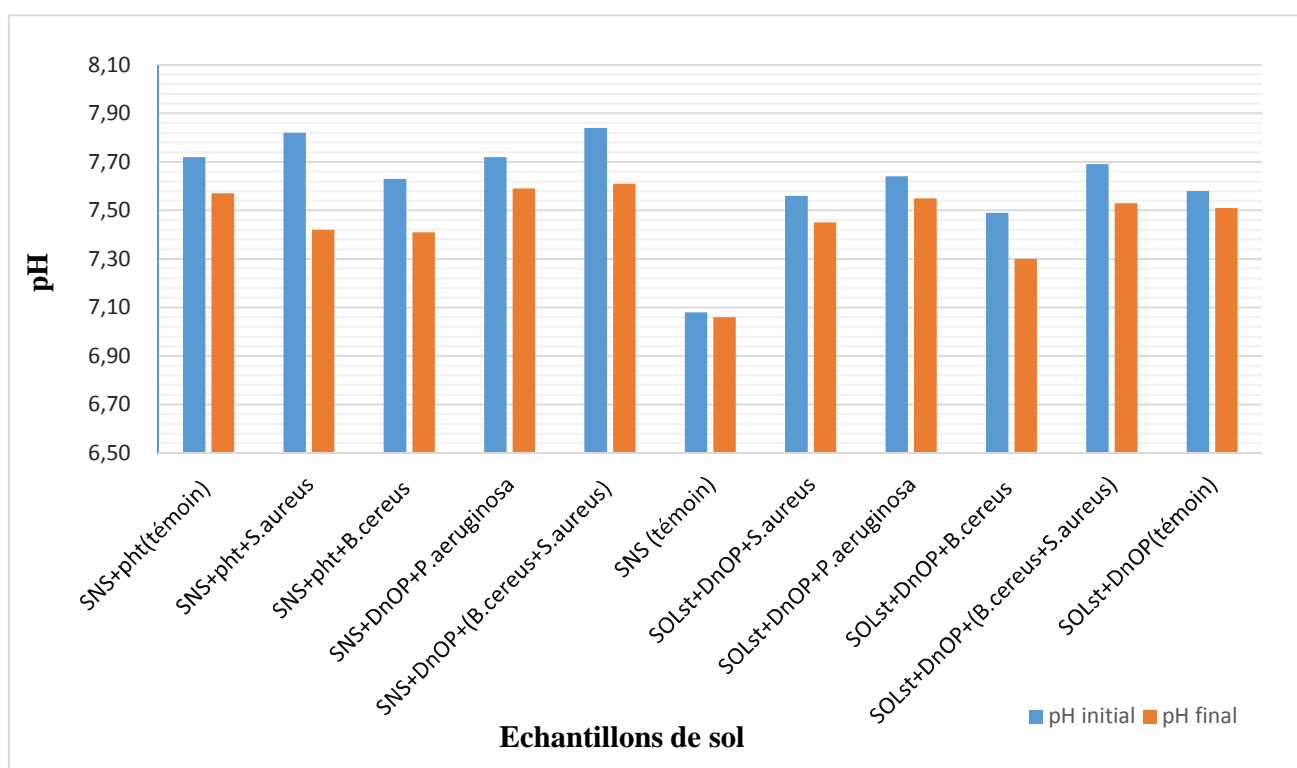


Figure 17 : Évolution du pH des échantillons de sol pollué par le DnOP

Afin d'analyser le pH des différents échantillons de sol en conditions initiales et finales, Le test de l'ANOVA a donné une p-value > 0, 05 (voir annexe VI, figure 6). Donc, le pH des échantillons de sol pollué par le DnOP ne présentent pas de différence significative.

En analysant la Figure 17, le pH du sol non pollué est pratiquement le même du fait de l'absence d'une activité bactérienne significative, alors qu'elle a été stimulée dans le sol pollué par le DnOP, étant utilisé comme substrat carboné.

On note aussi une légère baisse du pH final dans les échantillons de sol, ce qui serait dû à l'accumulation de produits intermédiaires comme l'acide phtalique et l'acide protocatechuique libérés lors de la dégradation des phtalates, comme cela a été cité par WANG *et al.* (2003). On peut donc supposer qu'il y a eu déminéralisation complète d'une fraction de ce polluant en CO₂ et H₂O (LIANG *et al.*, 2008).

La gamme de pH initial est de [7,49 - 7,84] et pour le pH final, elle est de [7,30 - 7,61], qui restent favorables à l'activité bactérienne.

2.1.1.3. Évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par le DnOP et le Cr VI

La figure ci- dessous représente l'évolution du pH des échantillons de sol pollués par le DnOP et le Cr VI.

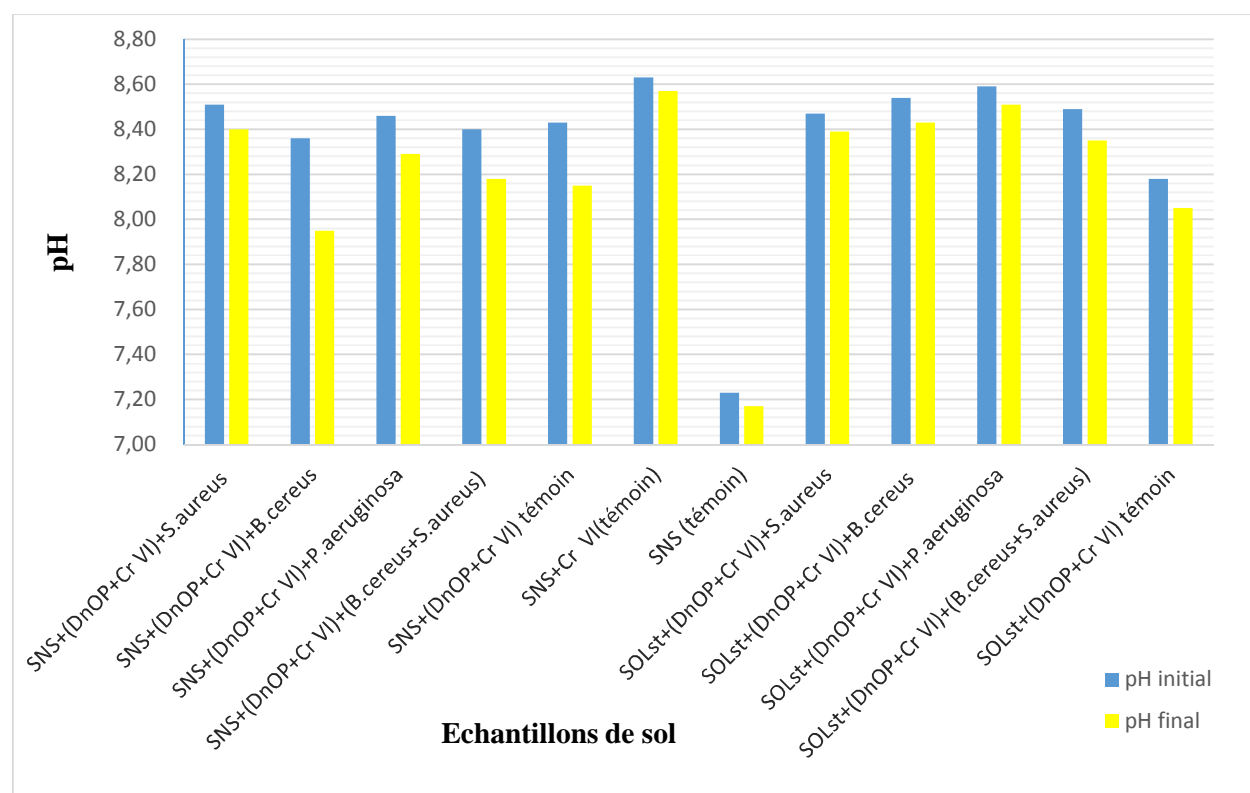


Figure 18 : Évolution du pH des échantillons de sol pollué par le DnOP et le Cr VI.

Afin d'analyser l'évolution du pH des échantillons de sol pollué par le DnOP et le Cr VI, le test de l'ANOVA a été effectué et a donné une p-value $< 0,05$. Il y'a une différence significative du pH entre les échantillons de sol (voir annexe VII, figure 7).

Les échantillons de sol pollués par le DnOP et le Cr VI présentent un pH initial plus élevé que le pH final (voir Figure 22), ceci serait dû à l'ajout du Cr VI qui présente un pH de 8,63 (cas de l'échantillon du SNS+Cr (témoin)).

Le test complémentaire de Neuwman-keuls a classé les échantillons de sol en deux groupes homogènes (voir figure 7 de l'annexe VII).

Selon JIN *et al.* (2011), cette légère augmentation de pH n'aurait pas un impact sur l'activité des souches inoculées, car l'intervalle de pH de nos souches est comme suit :

- *Bacillus cereus* : 4,35-9,3 (KRAMER et GILBERT,1989) ;
- *Pseudomonas aeruginosa* : 6 - 9 (RAHMAN *et al.*, 2005) ;
- *Staphylococcus aureus* : 4,2 - 9,3 (LE LOIR *et al.*, 2003).

2.1.2. Analyse du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI

2.1.2.1. Analyse du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI dans un sol pollué non inoculé

La figure 16 montre l'impact de la flore indigène sur les polluants présents dans le sol utilisé.

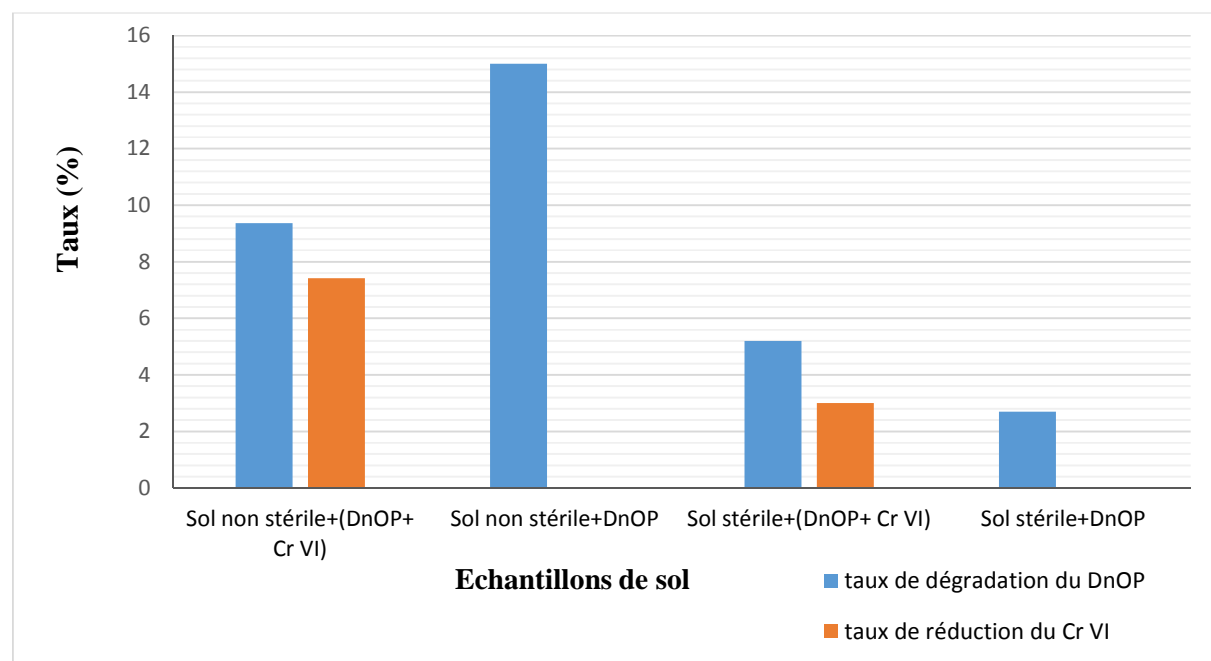


Figure 19 : Évolution du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI dans un sol pollué stérile et non stérile.

Nous remarquons que la dégradation du DnOP dans le sol stérile est très faible, contrairement au sol non stérile, montrant que la dégradation est dépendante des microorganismes présents dans le sol, ceci a été confirmé par ZHOU (2005). Ce très faible taux noté dans le sol stérile non inoculé est dû à une perte abiotique selon ZENG (2002).

Suite au même constat, WANG (2009) explique que la dissipation du DEHP par photo-oxydation et la volatilisation pourrait être négligeable du fait que le DEHP est une substance faiblement volatile avec une très faible pression de vapeur.

Le DEHP pourrait être utilisé par la flore indigène comme une source de carbone et d'énergie ; la biodégradation devrait être l'une des principales voies de sa dissipation (WANG, 2015). Ce résultat est de même pour le DnOP vu qu'il possède les mêmes caractéristiques que le DEHP.

WANG (2015) suggère qu'il y aurait un processus d'adaptation pour les microorganismes indigènes pour dégrader et utiliser les polluants comme source d'énergie.

Ceci a été confirmé par le test de l'ANOVA qui a donné une p-value $< 0,05$, donc il existe une différence significative entre le taux de dégradation du DnOP des échantillons de sol stérile et non stérile, le test complémentaire de Neuwman-Keuls a classé les échantillons de sol en deux groupes homogènes (voir figure 1 de l'annexe VII).

Concernant la réduction du Cr VI, les expériences avec du sol préalablement stérilisé ou non, ont montré qu'il y avait une assez faible participation de la flore indigène au processus de réduction du Cr VI (DESJARDIN, 2002). Selon le même auteur, ce taux de réduction est égal à 3 % dans un sol non stérile, alors que notre résultat est de 7,42 %.

Cette différence serait due à la nature du sol utilisé et son lieu de prélèvement, ainsi qu'aux différents paramètres lors de l'incubation (pH et température).

Le test de Student a donné une p-value < 0.05 , donc il existe une différence significative, la flore indigène a un impact sur le taux de réduction du Cr VI (voir figure 2 de l'annexe VII). LOSI *et al.* (1994) ont aussi prouvé que la réduction était beaucoup plus efficace si le sol contenait la microflore indigène.

2.1.2.2. Analyse du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI dans les échantillons de sol inoculés

Les résultats de l'analyse du taux de dégradation du DnOP et de réduction du Cr VI dans les divers échantillons de sol utilisés sont présentés par les graphes suivants.

2.1.2.2.1. Selon le type d'inoculum

2.1.2.2.1.1. DnOP

Le graphe ci-dessous détermine le lien entre le taux de dégradation du DnOP et le type d'inoculum.

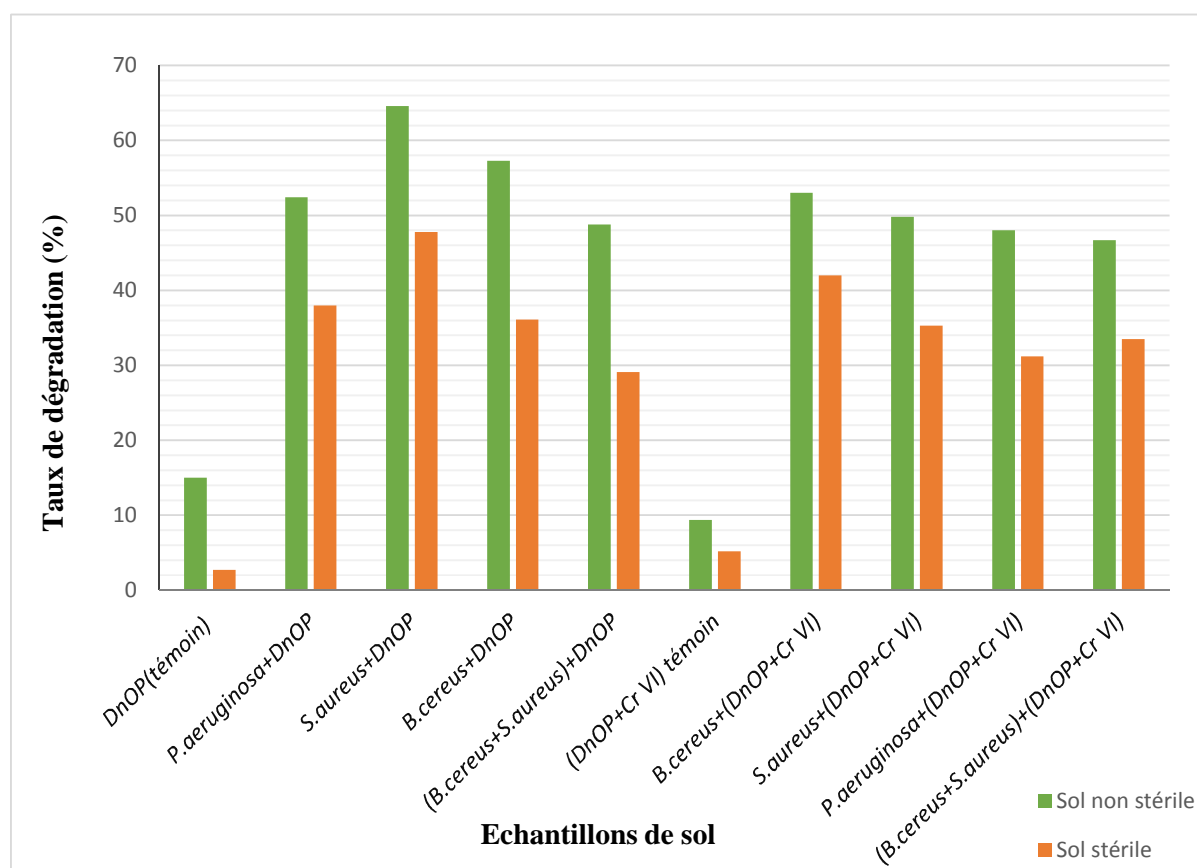


Figure 20 : Taux de dégradation du DnOP selon le type d'inoculum.

En analysant la figure 20, on constate que les échantillons enrichis avec les différentes souches bactériennes présentent un taux de dégradation supérieur aux échantillons non inoculés (témoins) (voir figure 20).

Ce même constat a été fait par WANG *et al.* (2015) qui a obtenu un taux de dégradation meilleur ($57.5\% \pm 9.1\%$), suite à l'ajout d'une culture bactérienne par rapport à celui obtenu par la flore indigène du sol ($4.2\% \pm 2.9\%$).

Le test de l'ANOVA pour les échantillons de sol pollués par le DnOP et (DnOP + Cr VI), a donné une p-value $> 0,05$, donc n'il n'y'a pas de différence significative entre le taux de dégradation du DnOP des différents échantillons, les inocula présentent des taux de dégradation presque similaires qui varient entre 46,7 % et 64,6 % pour les échantillons de sol non stérile inoculé et entre 29,1 % et 47,8 % pour les échantillons de sol stérile inoculé.

Concernant les échantillons de sol inoculés avec un consortium (*B.cereus* ATCC10876 et *S.aureus* ATCC43300), on remarque qu'ils présentent un taux de dégradation légèrement inférieur aux échantillons inoculés avec une seule souche, on suppose que ceci serait dû à l'effet inhibiteur exercé par l'une des souches bactériennes sur l'autre observé suite à un test par piqure sur gélose LB (voir figure 21).



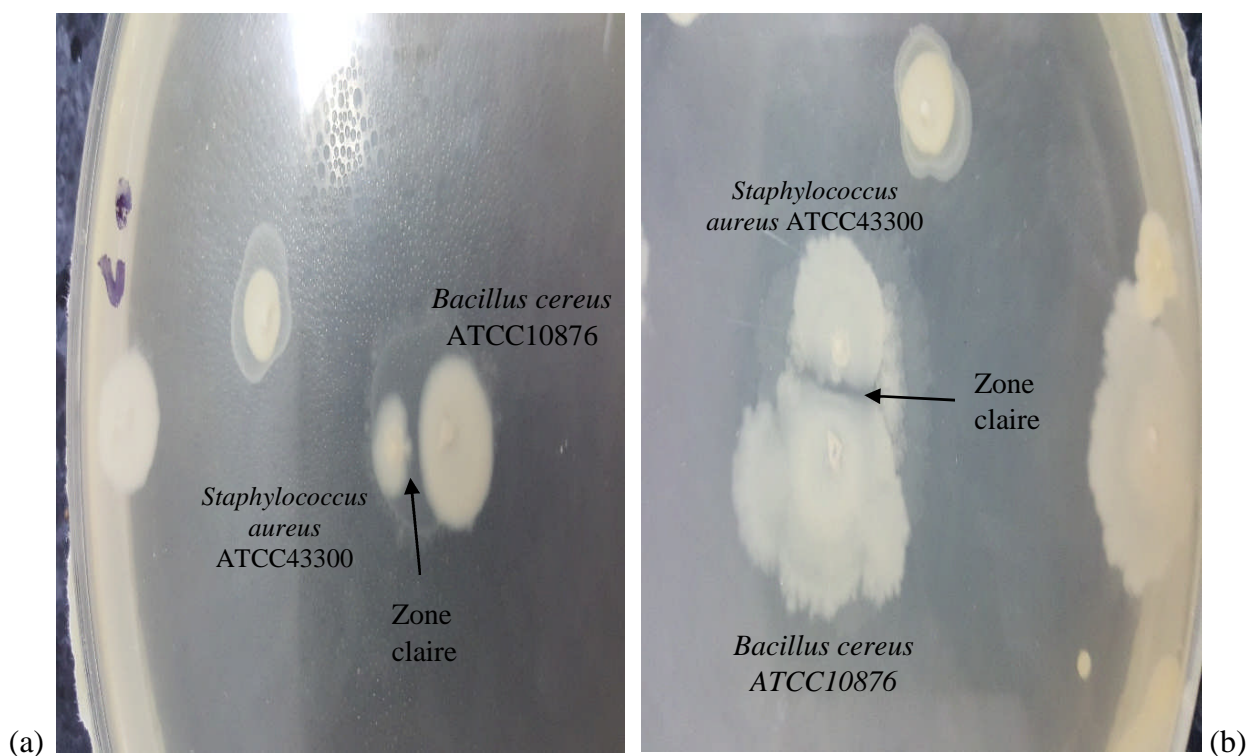


Figure 21 : Interaction entre *Bacillus cereus* ATCC10876 et *Staphylococcus aureus* ATCC43300 par piqueure sur gélose LB ((a) : interaction entre *B. cereus* et *S. aureus* par piqueure centrale ; (b) : interaction entre *B. cereus* ATCC10876 et *S.aureus* ATCC43300 après 24 h d'incubation ; (c) : après 72 h d'incubation).

On constate aussi que *S.aureus* ATCC43300 présente un meilleur taux de dégradation par rapport aux deux autres souches, qui est de 64,6 % pour le sol non stérile et de 47,8 % pour le sol stérile.

Nous avons obtenu des rendements de dégradation du DnOP différents et inférieurs aux résultats obtenus par d'autres auteurs, ceci pourrait être dû au type de l'inoculum utilisé et/ou à la longueur de la chaîne alkylée (CHANG *et al.*, 2004).

En effet, CHOU et WRIGHT (2006), expliquent que la difficulté de la dégradation du DEHP (ce qui est de même pour le DnOP) serait due au fait qu'il soit un composé hydrophobe avec une longue chaîne alkyle qui pourrait être donc fortement absorbé par la matière organique du sol.

Selon LIANG *et al.* (2008), la température, la durée d'incubation, le pH, le type de phthalate utilisé et de l'inoculum peuvent influencer le taux de dégradation.

2.1.2.2.1.2. Cr VI

Le graphe ci-dessous démontre le lien entre le taux de réduction du Cr VI et le type d'inoculum.

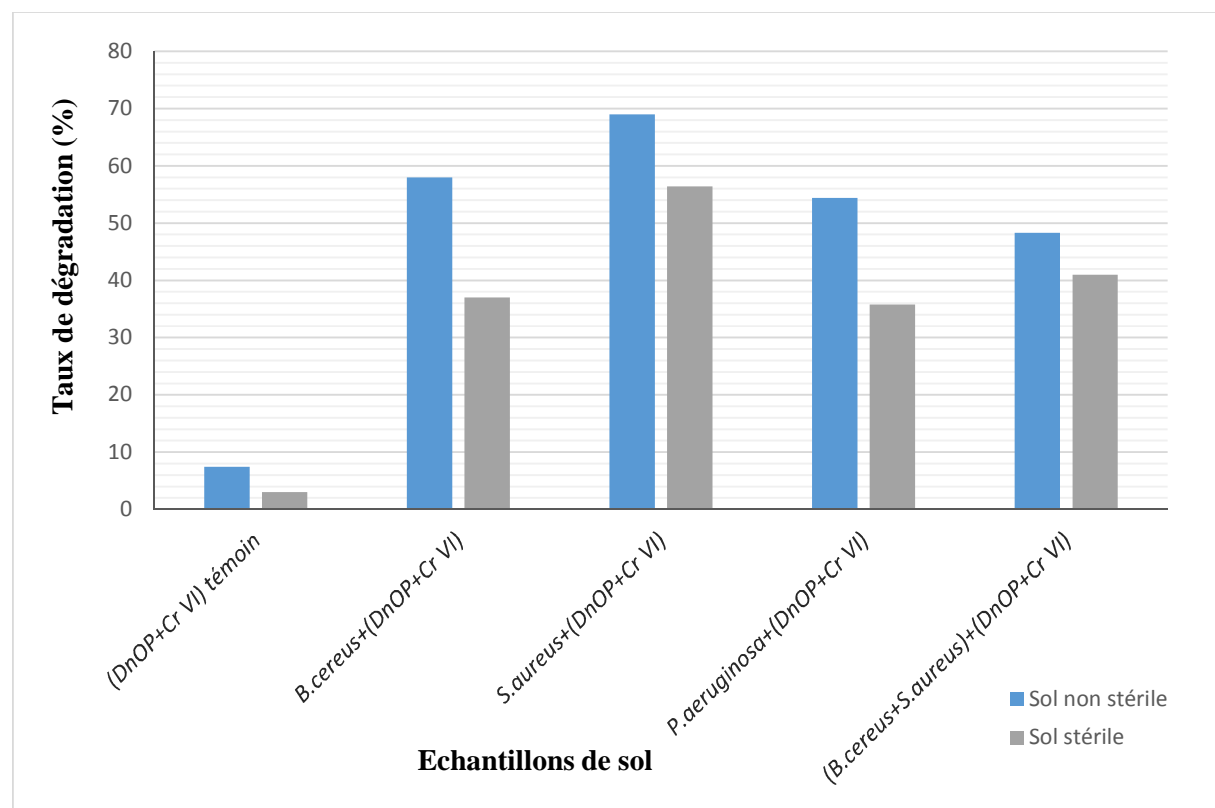


Figure 22 : Taux de réduction du Cr VI selon le type d'inoculum.

D'après la figure 22, on remarque que le taux de réduction du chrome des différents échantillons est presque similaire. Ceci a été confirmé par le test de l'ANOVA qui a donné une $p\text{-value} > 0,05$ (voir figure 10, annexe VII). Donc, il n'y a pas de différence significative entre le taux de réduction des échantillons de sol pollué et inoculé. On conclue que le type de traitement n'influe pas sur le taux de réduction du Cr VI.

Le taux de réduction du Cr VI dans le sol non stérile et non inoculé est assez faible. Cela a été observé par DESJARDIN (2002), qui explique que la microflore indigène n'est pas adaptée à la présence de ce dernier.

Un très faible taux de réduction du Cr VI est observé dans le sol stérile non inoculé, ceci serait dû à une réduction chimique en présence de la matière organique selon le même auteur. Selon la littérature, il existe dans les sols des agents réducteurs qui peuvent transformer le Cr VI en Cr III. Il s'agit de la matière organique et des ions Fe^{2+} .

On constate aussi, que le taux de réduction du Cr VI des échantillons de sol non stérile et inoculé est meilleur que celui des échantillons de sol stérile et inoculé.

LOSI *et al.* (1994) ont prouvé que la réduction était beaucoup plus efficace si le sol contenait la microflore indigène.

Le consortium formé par *B.cereus* ATCC 10876 et *S.aureus* ATCC43300 dans un sol non stérile présente un taux de réduction légèrement inférieur aux échantillons de sol non stérile inoculé avec une seule souche bactérienne. On suppose qu'il y aurait une compétition entre la flore indigène et le consortium bactérien. Une différence du taux de réduction dans un sol stérile et non stérile inoculé avec le consortium serait due à une inhibition entre les deux souches en question (voir figure 21).

On observe que, l'échantillon présentant le meilleur taux de réduction est celui inoculé avec *S.aureus* avec un taux de 69 % pour le sol non stérile et de 56,4 pour le sol stérile.

D'après ZHANG *et al.* (2013), *S.aureus* aurait la meilleure tolérance au Cr VI que n'importe quelle autre souche bactérienne aérobie réductrice du Cr VI.

Selon les mêmes auteurs, une sous-espèce de *S.aureus* est capable de réduire le Cr VI à un taux de 94,5 % en 120 heures à une concentration de 0,4 mM.

2.1.2.2.2. Effet de la présence du Cr VI sur la dégradation Du DnOP

Les résultats de l'analyse du taux de dégradation du DnOP en présence du Cr VI sont schématisés dans la figure

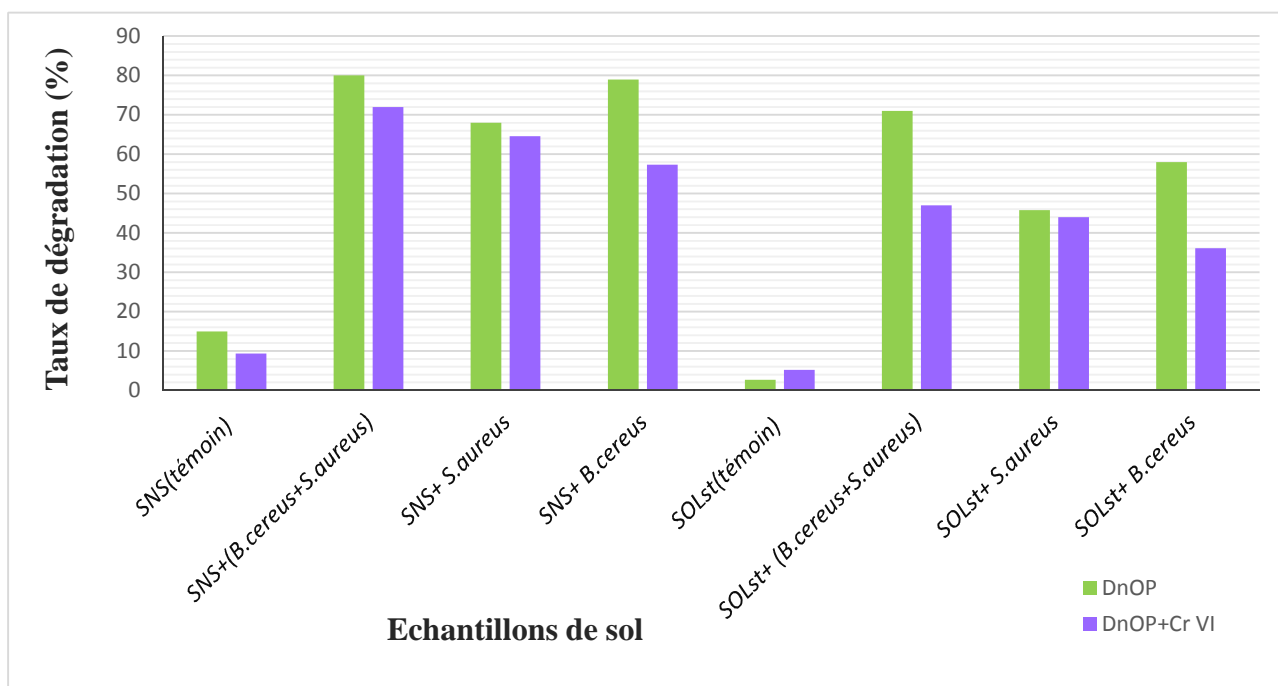


Figure 23 : Effet de la présence du Cr VI sur le taux de dégradation du DnOP dans les échantillons de sol.

Il est bien connu que la présence des métaux lourds dans les eaux usées peut affecter de manière significative les performances des procédés de traitements biologiques des déchets (CHUA *et al.*, 1999). Cependant, on sait peu sur les effets des métaux lourds sur la dégradation des phtalates par les microorganismes (JIN *et al.*, 2011).

Dans notre étude nous nous sommes intéressées à l'étude de l'impact de la présence du Cr VI sur la biodégradation du DnOP.

Nous rappelons que les souches bactériennes du genre *Pseudomonas* sp. et *Bacillus* sp. ont prouvé leur capacité de réduction du Cr VI (DESJARDIN, 2002).

Pour déterminer l'effet de la présence du chrome sur le taux de dégradation du DnOP, le test de l'ANOVA a été effectué, ce dernier a donné une p-value $> 0,05$ (voir annexe VIII, figure 10), qui ne présente pas de différence significative entre les échantillons de sol pollués par le DnOP et ceux pollués par le DnOP+Cr VI. Donc, le chrome n'aurait pas d'impact sur le taux de dégradation du DnOP.

JIN *et al.* (2011), ont constaté que la souche QH-6, identifiée comme étant *Diaphorobacter* sp. dégrade très faiblement le DBP en présence du Cr VI, ce taux de dégradation est de 27,07 % en 12 heures à une concentration de 30 mg/L de Cr VI.

Selon les mêmes auteurs, ce faible taux de dégradation serait dû à la capacité du Cr VI à se combiner chimiquement aux enzymes responsables de la dégradation du DBP.

Nos résultats diffèrent avec ceux trouvés par les auteurs cités auparavant, ceci pourrait être lié au type de polluant utilisé qui est le DnOP, la longueur de sa chaîne alkyle, ainsi que sa concentration et celle du Cr VI.

WANG *et al.* (2004), expliquent que la dégradation des phtalates est liée à la longueur de la chaîne alkyle.

On remarque aussi, d'après la figure 21, que les échantillons ayant donné le meilleur taux de dégradation du DnOP en présence du Cr VI, sont ceux du sol non stérile avec des taux allant de 57,3 % à 72 %. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'il y a eu atténuation de la toxicité du Cr VI suite à sa réduction par la flore indigène.

2.1.3. Analyse de l'activité enzymatique

2.1.3.1. Effet des polluants sur l'activité de la catalase des souches présentes dans les échantillons de sol

L'évolution de l'activité de la catalase en fonction du temps par titrage du KMnO_4 est représentée dans la figure suivante.

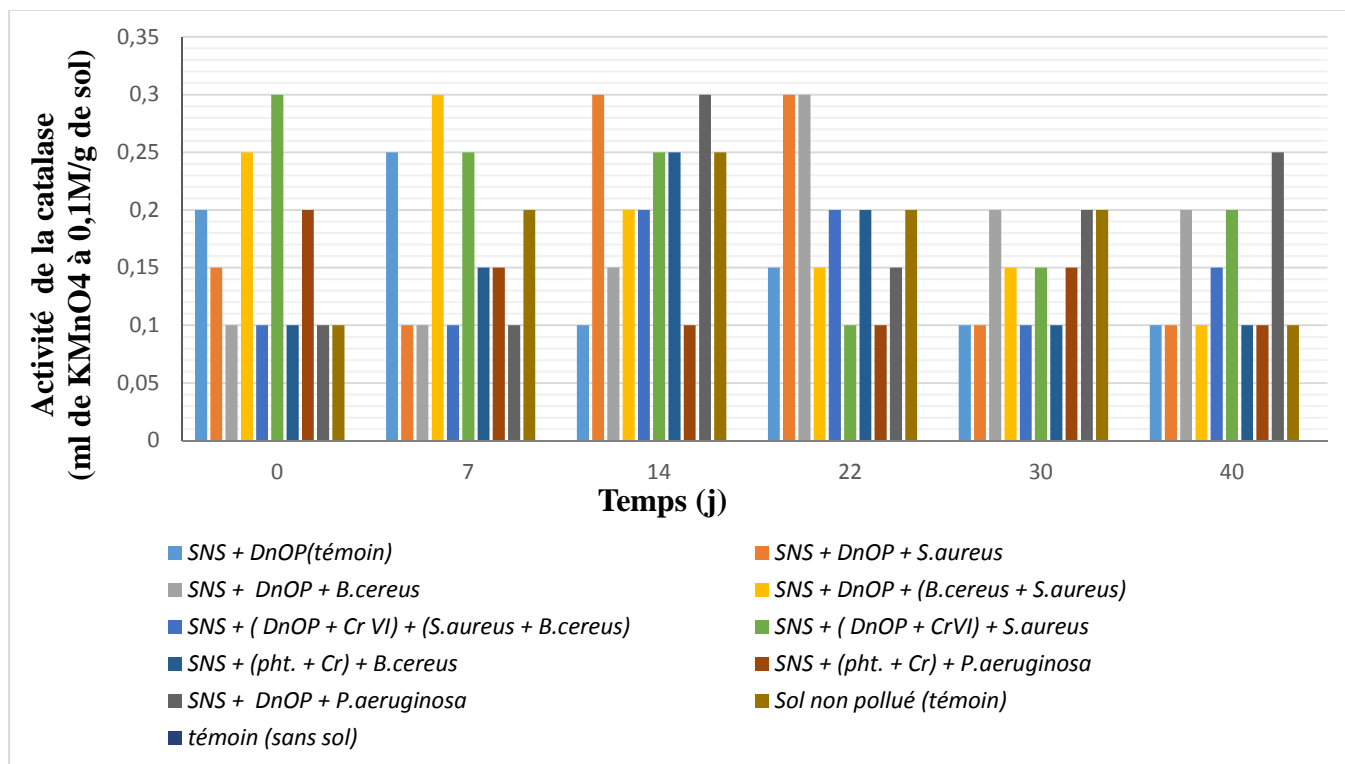


Figure 24 : Évolution de l'activité enzymatique (catalase) en fonction du temps d'incubation du sol pollué non stérile.

En général, les propriétés biologiques et biochimiques du sol sont sensibles aux pollutions. Ces propriétés jouent un rôle très important et pourrait indiquer l'influence des polluants sur l'écosystème du sol.

D'après TENG *et al.* (2010), l'activité enzymatique du sol peut être utilisée pour décrire les conditions générales des populations microbiennes de ce sol.

Dans notre étude, par manque de moyens, nous nous sommes limitées uniquement au suivi de l'activité de la catalase des échantillons de sol pollué.

La catalase est une enzyme intracellulaire oxydoréductase, utilisée pour l'identification des bactéries, elle protège la cellule des dommages causés par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Les variations de l'activité de la catalase dans les échantillons de sol pollué lors de l'expérience qui a duré 40 jours sont représentées par la figure 24.

Nous remarquons qu'en absence d'inoculum, l'activité de la catalase a augmenté dès les premiers jours d'incubation puis une baisse a été constatée dès le 7^{ème} jour. Contrairement aux échantillons de sol pollué par le DnOP et inoculé par *S.aureus* ATCC43300 et *B.cereus* ATCC10876, une baisse de l'activité a été constatée durant les premiers jours d'incubation et une augmentation au 14^{ème} jour, suivie d'une baisse à nouveau vers la fin du temps d'incubation (40^{ème} jour).

Cependant, l'activité de la catalase des échantillons de sol pollué et inoculé par *P.aeruginosa* ATCC27853 a augmenté légèrement au 40^{ème} jour.

Pour les échantillons de sol pollué par le DnOP et inoculé par le consortium formé de *S.aureus* ATCC43300 et *B.cereus* ATCC10876, une augmentation a été constatée au 7^{ème} jour suivie d'une baisse tout au long du temps d'incubation. Alors qu'en présence du Cr VI, une augmentation n'a été constatée qu'à partir du 14^{ème} jour puis une baisse à partir du 30^{ème} jour.

Les échantillons de sol pollué par le DnOP + Cr VI et inoculé par *P.aeruginosa* ATCC27853 et *S.aureus* ATCC43300 ont connu une augmentation de l'activité de la catalase dès le premier jour puis une baisse à partir du 30^{ème} jour. Cependant, ceux inoculé par *B.cereus* ATCC10876, l'augmentation n'a eu lieu qu'à partir du 7^{ème} jour suivie d'une baisse rapide à partir du 22^{ème} jour. Ceci pourrait être expliqué par l'effet toxique du Cr VI nécessitant aux souches un temps d'adaptation

Selon ZHOU (2005), l'activité élevée de la catalase à une phase du temps d'incubation serait due au fait que le DnOP a agi en tant que substrat induisant ainsi une augmentation de la biomasse microbienne, ce qui stimule l'activité de cette enzyme. Elle pourrait aussi être expliquée selon SHEN *et al.* (2005) par l'adaptation des microorganismes du sol à ce polluant quand le temps d'exposition est assez long.

L'activité de la catalase dans tous les échantillons de sol a diminué progressivement à la fin du temps d'incubation, notre résultat est en accord avec les études de HERNANDEZ et ALMANSA (2002).

Cette baisse serait dû à la diminution de la biodisponibilité du DnOP avec le temps et son vieillissement (SHEN *et al.*, 2005).

D'après le résultat du test de l'ANOVA donnant une p-value $> 0,05$ (voir annexe VII, figure 11), on constate qu'il n'y a pas de différence significative entre l'activité de la catalase des différents échantillons du sol pollué et inoculé, et entre ces échantillons avec le témoin (sol non pollué) en fonction du temps.

On conclue que le DnOP n'a pas d'effet significatif sur l'activité de la catalase, comme cela a été confirmé par CHEN *et al.* (2013).

Les dérivés phtaliques comme le DEP et le DMP présentent un effet significatif, lorsque la concentration du polluant est supérieur à 100mg/kg de sol, contrairement aux DnOP et le DEHP qui n'ont pas d'impact significatif sur l'activité microbienne (LIU *et al.*, 2009).

D'après HEIPIEPER *et al.*(1994), le DnOP possède un coefficient octanol-eau ($\log K_{ow}$) > 5 , (composé hydrophobe), ce qui confirme que ce dernier est moins toxique pour les cellules.



*Conclusion
et
perspectives*

Les phtalates ont été classés par l'agence américaine de la protection de l'environnement et le centre national chinois du control environnemental comme des polluants à priorité, vu qu'ils agissent comme des perturbateurs endocriniens causant des anomalies reproductives et des malformations de certains organes (FOSTER, 2006 ; SWAN, 2008).

Le processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions influant sur l'activité bactérienne (ECKFORD et *al.*, 2002), à savoir la toxicité des polluants, les conditions environnementales ou la biodisponibilité des éléments nutritifs (GABET, 2004).

L'objectif de notre travail était en premier lieu à tester la capacité de certaines souches de laboratoire de microbiologie à dégrader les phtalates (DnOP) et le chrome (Cr VI) dans un sol pollué artificiellement ceci après une étape d'adaptation de ces souches bactériennes à ces polluants.

Différents paramètres ont été étudiés tels que le type de l'inoculum et la présence de la flore indigène afin de déterminer leur impact sur le taux de dégradation du DnOP et le taux de réduction du Cr VI.

En premier lieu, nous avons constaté que le taux de dégradation du DnOP et la réduction du Cr VI dans un sol non stérile et non inoculé a donné un meilleur rendement par rapport au sol stérile non inoculé, qui a atteint 15 % pour les échantillons de sol pollués uniquement par le DnOP, 9,36 % dans les échantillons pollués par le (DnOP + Cr VI).

Pour ce qui est du taux de réduction du chrome, il a atteint 7,42% dans l'échantillon de sol non stérile et non inoculé.

En ce qui concerne la dégradation du DnOP dans les échantillons de sol bioaugmentés (inoculés), *S.aureus* ATCC 43300 a donné le meilleur taux de dégradation du DnOP, il est de 64,6 % dans un sol non stérile et de 47,8% dans un sol stérile. Le consortium formé de *S.aureus* ATCC 43300 et de *B.cereus* ATCC10876 présente un taux légèrement inférieur au taux de dégradation dans les échantillons de sol inoculé avec une seule souche bactérienne, c'est le cas aussi pour le chrome. Cette baisse serait due à l'effet inhibiteur exercé par les souches de *S.aureus* sur les souches de *B. cereus* qui a été observé suite à un test de croissance sur gélose.

S.aureus ATCC 43300 présente aussi un meilleur taux de réduction qui est de 69% pour le sol non stérile et de 56,4% pour le sol stérile.

L'analyse du pH a permis de dire que ce dernier n'avait pas d'impact sur la flore indigène dans un sol pollué et non stérile et qui reste favorable à l'activité microbienne (pH compris entre 7,47 et 8,53). Le même constat a été fait pour les échantillons de sol pollué et bioaugmenté.

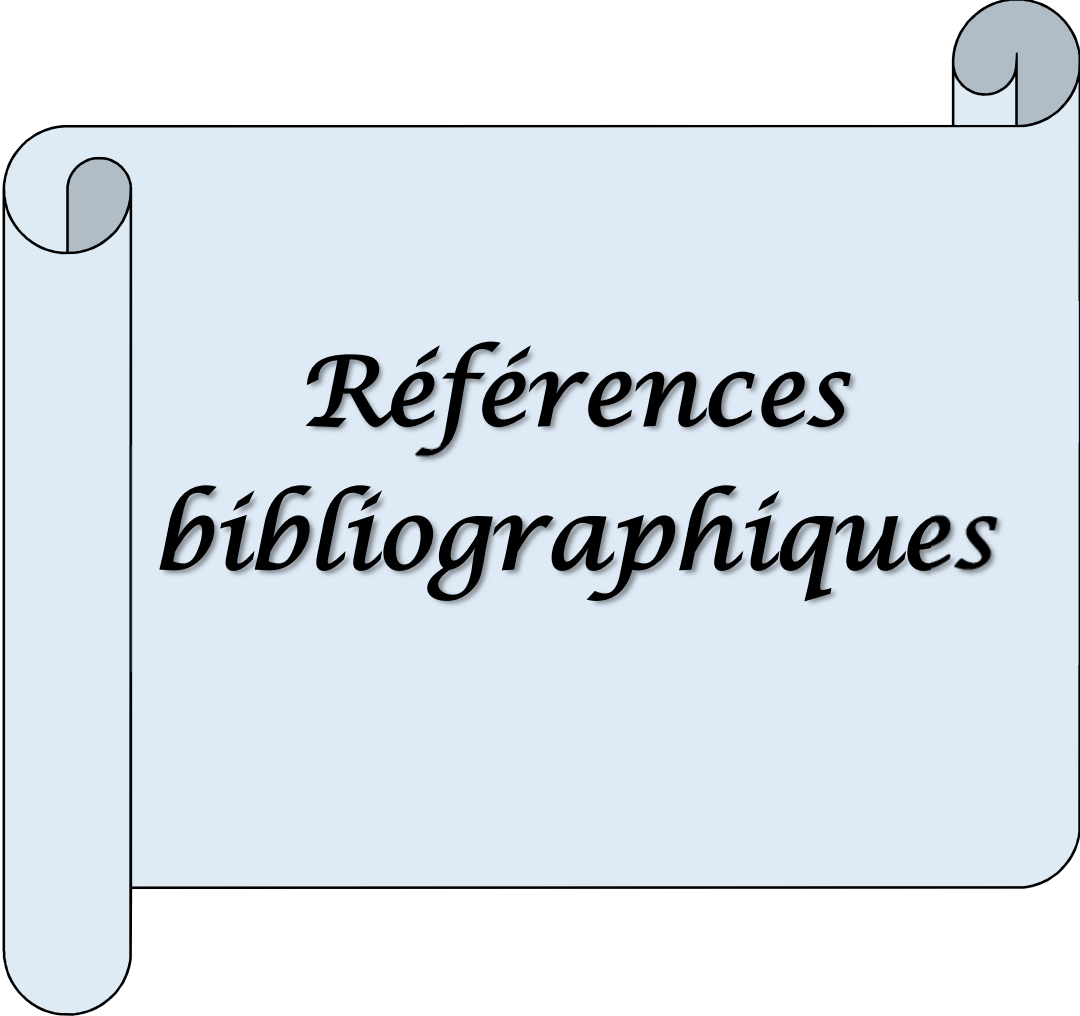
Conclusion et perspectives

Nous avons voulu savoir si la présence d'un autre polluant affectait le taux de dégradation du DnOP. Nos résultats montrent que le chrome ne présenterait pas cet effet.

Le suivi de l'activité enzymatique (catalase) a montré qu'ils n'y avait pas de différence entre tous les échantillons et que les polluants n'affecte pas l'activité bactérienne.

L'ensemble de ces résultats obtenus ne constitue qu'une partie de l'étude de la biodégradation du DnOP et du chrome dans le sol. En perspective, il serait souhaitable de compléter cette étude par une approche plus approfondie, à savoir :

- Optimisation des paramètres de traitement (ajout de surfactants, enrichissement par nutriments comme l'azote, le phosphore...etc) ;
- Utilisation de la technique d'immobilisation des cellules bactériennes pour un meilleur rendement ;
- Une analyse qualitative des métabolites issus de la dégradation des phtalates présents dans notre sol permettrait de mieux comprendre le mécanisme microbien impliqué dans la biodégradation.
- Utilisation d'une culture mixte de plus de deux souches bactériennes pour tester leur aptitude à dégrader les polluants ;
- Étude approfondie des interactions entre les souches bactériennes utilisées ;
- Étude de l'effet de la variation de certains paramètres comme : Température d'incubation, oxygénation, humidité, pH ;
- Analyse de l'activité d'autres enzymes comme : Uréase, phosphatase...etc.



*Références
bibliographiques*

- **ABDELLY C. (2007)**. Bioremédiation / Phytoremédiation. Série N° 232. Université de Tunis Institut Supérieur de l'Éducation et de la Formation Continue Département des Sciences Naturelles
- **ADEME L. (1995)**. Les micropolluants organiques dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines, 221 p.
- **BAIZE D. (2000)**. Guide des analyses en pédologie. 2ème Ed. Technique et pratique INRA Edition. Paris.p 412
- **BALLERINI D. (1999)**. « Traitement biologique des sols » technique de l'ingénieur, vol G2.
- **BALLERINI D. et VANDECASTEELE J. P. (1999)**. La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In : Biotechnologie, coordonateur R. Scriban, 5ème édition, Edition Tec et Doc .p 835- 865.
- **BARCELOUX D.G. (1999)**. Chromium. *Clinical Toxicology.*, 37(2): 173-194.
- **BARRON M. G., ALBIO P. W. et HAYTON W. L. (1995)**. Biotransformation of di (2-ethylhexyl) phthalate by Rainbow trout. *Environmental Toxicology Chemistry.*14: 873 - 876.
- **BOPP L. H. et EHRLICH H. L. (1988)**. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. *Archives of Microbiology.* vol. 150, pp 426-431.
- **BOUCHESEICHE C., CREMILLE E., PELTE T. et POJER K. (2002)**. Pollution toxique et écotoxicologique : notions de base. Guide technique N°7. Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, Montpellier (France).
- **CARTWRIGHT C. D., OWEN S. A., THOMPSON I. P., BURNS R. G. (2000)**. Biodegradation of diethyl phthalate in soil by a novel pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 186 (1/1) : 27-34.
- **CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC**. Détermination du chrome hexavalent : méthode colorimétrique, MA.200-crHex 1.1, Rév.1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, **2010**, 10p.
- **CERVANTES C., CAMPOS-GARCIA J., DEVARS S., GUTIERREZ-CORONA F., LOZA-TAVERA H., TORRES-GUZMAN J. C., et MORENO-SANCHEZ R. (2001)**. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology. Review.*, 3 (25): 335-347.

- **CHANG B. V., YANG C. M., CHENG C. H. et YUAN S. Y. (2004).** Biodegradation of phthalate esters by two bacteria strains. *Chemosphere*. 55: 533-538.
- **CHANG B. V., WANG T. H. et YUAN S. Y. (2007).** Biodegradation of four phthalate esters in sludge. *Chemosphere.*, 69 : 1116 – 1123.
- **CHASSIN P., BAIZE D., CAMBIER PH. et 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.
- **CHEN HUILUN, RENSHENG ZHUANG, JUN YAO, FEI WANG, YIGUANG QIAN. (2013).** A Comparative Study on the Impact of Phthalate Esters on Soil Microbial Activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 91: 217–223.
- **CHRÉTIEN J. et THIEBLEMONT M. (1974).** Un mécanisme intermédiaire dans la carcinogénèse pulmonaire. *Nouv. Presse Med.*, 3: 1347.
- **COLOMBANO S., A. SAADA, V. GUERIN, P. BATAILLARD, G. BELLENFANT, S. BERANGER, D. HUBE, C. BLANC, C. ZORNIG ET I. GIRARDEAU. (2010).** Quelles techniques pour quels traitements - Analyse coûts-bénéfices Rapport Final BRGM/RP - 58609 – FR Juin 2010.
- **COMEAU S. Y. (1999).** Biorestauration des sols contaminés. Cours professeur à l'Ecole Polytechnique de Montréal, Etudes supérieures en génie de l'environnement. Ecole supérieure des mines de Saint-etienne. p168-275.
- **DAVIS J. W. et MADSEN S. (1996).** "Factors affecting the biodegradation of toluene in soi. *chemosphere*, 1 (33):107-130.
- **DELARAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Techniques et Documentation*. Lavoisier, Paris.
- **DESJARDIN V., BAYARD R., HUCK N., MANCEAU A., et GOURDON R. (2002).** Effect of microbial activity on the mobility of chromium in soils. *Waste Management*, vol. 22, pp 195-200.
- **DHAKEPHALKAR P. K., BHIDE J. V., et PAKNIKAR K. M. (1996).** Plasmid mediated chromate resistance and reduction in *Pseudomonas mendocina* MCM B-180. *Biotechnology Letters.*, 10 (18):1119-1122.
- **DOMINIQUE J. (1997).** La recherche des polluants dans les sols. Séminaire "Sols Pollués", Paris, France. pp.19-28.
- **EJLERTSSON J., SVENSSON B. (1995).** A review of the possible degradation of polyvinyl chloride (PVC) plastics and its components, phthalic acid esters and vinyl

- chloride, under anaerobic conditions prevailing in landfills. Dept of Water and Environmental Studies. Linkoping University, Sweden, 20 p.
- **EMA M., KUROSAWA R., AMANO H. et OGAWA Y. (1995).** Developmental toxicity evaluation of mono-n-butyl phthalate in rats. *Toxicology Letters*, 78: 101 - 106.
 - **FAVA L., ORRÙ M. A., CROBE A., BARRA CARACCILO A., BOTTONI P. et 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.
 - **FOSTER P. M. D. (2006).** Disruption of reproductive development in male rat spring following in utero exposure to phthalate esters. *International Journal of Andrology*, 29: 140-147.
 - **GUELTON S. (1999).** les enjeux financiers de la depollution des anciens sites industriels/Financial issues related to the cleaning up former industrial sites, *Revue de géographie de Lyon*, 74(3) : 233-241.
 - **GVOZDYAK I., MOGILEVICH N. F., RYLSKII A. F., et GRISHCHENKO N. I. (1986).** Reduction of hexavalent chromium by collection strains of bacteria. *Mikrobiologiya*, vol. 55, pp 962-965 .
 - **HERNANDEZ J. A. et ALAMANSA M. S. (2002).** Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 115: 251-257
 - **HIMEL C. M., LOATS H. et 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.
 - **HINTON R. H., MITCHELL F. E., MANN A., CHESCOE D., PRICE S. C. et NUNN A. (1986).** Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid. *Environmental Health Perspect.* 70:195-210.
 - **IGNATIADIS I., CASTAGNÉ S. et MORIN D. (2004).** Traitement in situ du chrome hexavalent contenu dans un sol industriel non saturé : procédé d'immobilisation par l'hydrosulfite de sodium. Rapport final. BRGM/RP-53164-FR, 158 p., 47 ill., 10 ann.
 - **Institut National de Recherche et de Sécurité (INRES). (2005).** Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques p4 sur 80.

- **JAYANTHI M., KANCHANA D., SARANRAJ P., et SUJITHA D. (2013).** Bioremediation of Toxic Heavy Metal Chromium in Tannery Effluent Using Bacteria. *Applied Journal of Hygiene.*, 2 (2): 08-14.
- **JEANNOT R., LEMIÈRE B., CHIRON S., AUGUSTIN F. et DARMENDRAIL D. (2000).** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. France.
- **JIN DECAI, PING WANG, ZHIHUI BAI, JIN BO, ZUOPENG LV., DONGBIN WEI et GUOQIANG ZHUANG. (2011).** Biodegradation of di-n-butyl phthalate by a newly isolated *Diaphorobacter* sp. strain QH-6. *African Journal of Microbiology Research*, 5(11) : 1322-1328.
- **JIN DECAI., XIAO KONG., YUJIE LI., ZHIHUI BAI., GUOQIANG ZHUANG., XULIANG ZHUANG et YE DENG. (2015).** Biodegradation of di-n-Butyl Phthalate by *Achromobacter* sp. Isolated from Rural Domestic Wastewater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 : 13510-13522.
- **JOURNAL OFFICIEL DE LA COMMUNAUTÉ EUROPÉENNE (JOCE). (1996).** Commission Directive 96/54/EC, 22th time Council directive 67/548EEC. Official Journal of the European Communities.
- **JOCE. (1998).** Commission Directive 98/98/EC, 25th time Council directive 67/548EEC. Official Journal of the European Communities.
- **JOCE. (2000).** Commission Directive 2000/32/EC, 26th time Council directive 67/548EEC. Official Journal of the European Communities.
- **JOCE. (2004).** Commission Directive 2004/73/EC, 29th time Council directive 67/548EEC. Official Journal of the European Communities.
- **KAVLOCK R., BOEKELHEIDE K., CHAPIN R., CUNNINGHAM M., FAUSTMAN E., FOSTER P., GOLUB M., HENDERSON R., HINBERG I., LITTLE R., SEED J., SHEA K., TABACOVA S., TYL R., WILLIAM P. et ZACHAREWSKI T. (2002) a.** NTP center for the evaluation of health risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reproduction Toxicology*, 16 : 489 - 527.

- **KAVLOCK R., BOEKELHEIDE K., CHAPIN R., CUNNINGHAM M., FAUSTMAN E. et FOSTER P. (2002) b.** NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert report on the reproductive and developmental toxicity of DnOP. *Reproduction Toxicology.*, 16: 721 - 734.
- **KAVLOCK R., BOEKELHEIDE K., CHAPIN R., CUNNINGHAM M., FAUSTMAN E., FOSTER P., GOLUB M., HENDERSON R., HINBERG I., LITTLE R., SEED J., SHEA K., TABACOVA S., TYL R., WILLIAMS P. et ZACHAREWSKI T. (2002) c.** NTP center for the evaluation of health risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reproduction Toxicology.*, 16 : 453 - 487.
- **KAVLOCK R., BOEKELHEIDE K., CHAPIN R., CUNNINGHAM M., FAUSTMAN E. et FOSTER P. (2002) d.** NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert report on the reproductive and developmental toxicity of DEHP. *Reproduction Toxicology.*, 16 : 529 - 653.
- **KOCH H. M., DREXLER H. et ANGERER J. (2003).** An estimation of the daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206 : 77-83.
- **KRAMER J. M. et GILBERT R. J. (1989).** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In *Foodborne Bacterial Pathogens*. Doyle, M.P., ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY.
- **LAHOUSSINE V. (2000).** Contamination par des di-esters de l'acide phtalique (phtalates) dans l'environnement aquatique en Ile de France. Thème : l'alimentation en eau potable. Rapport d'étude de l'Université de Paris-Sud, 46 p.
- **LE HECHO I., TELLIER S. et ASTRUC M. (1998).** Industrial site soils contaminated with arsenic or chromium : Evaluation of the electrokinetic method. *Environmental Technology*, vol 19 : 1095-1102.
- **LE LOIR Y., BARON F., et GAUTIER M. (2003).** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research : GMR*, 2(1), 63-76.
- **LEAHY J. G. et COLWELL R. R., 1990.** Microbial Degradation of hydrocarbons in the Environment. *Microbiology Revue.* p 54: 305-315 .
- **LECOMPTE P., 1995.** Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Edition Lavoisier , tec et doc .p198 .

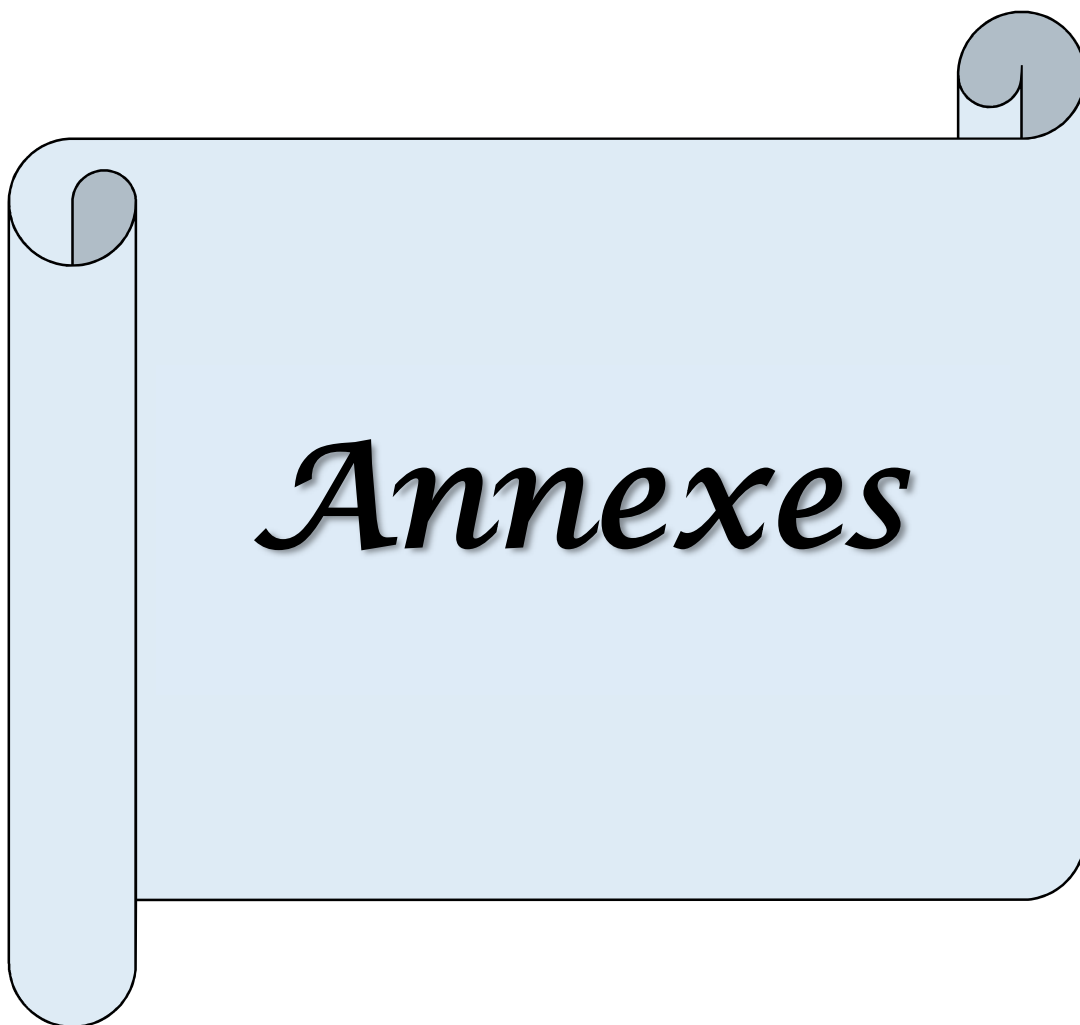
- **LEE S.H., LEE S., KIM D.Y. et KIM J.G. (2007).** Degradation characteristics of waste lubricants under different nutrient conditions, *Journal of Hazardous Materials*. 143: 65–72.
- **LIANG D. W., ZHANG T., FANG H., H. P. et HE J. (2008).** Phthalates biodegradation in the environment. *Applied Microbiology Biotechnology*. 80: 183-198.
- **LIDE D. R. (2009).** CRC Handbook of Chemistry and Physics, CRC Presse Inc, 90^{ème} édition, 2804 p., relié.
- **LICHTFOUSE ERIC. (1997).** Soil, a sponge for pollutants. Analysis, *EDP Sciences*, 25 (8), pp.M16-M23.
- **LIU Y., GUAN Y., YANG Z., CAI Z., MIZUNO T., TSUNO H., ZHU W. et ZHANG X. (2009).** Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Ecotoxicology*, 18:293–303.
- **LOSI M. E., AMRHEIN C., et FRANKENBERGER Jr, W. T. (1994).** Environmental Biochemistry of Chromium. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 136: 91-121.
- **LOVEKAMP-SWAN T., DAVIS B. J. (2003).** Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environmental Health Perspect* 111(2):139-145.
- **LUND T. (2000).** Note d’information sur les perturbateurs endocriniens. Commission de la santé publique et de la politique des consommateurs. Parlement Européen, 1999 - 2004.
- **MACKINTOSH C. E, MALDONADO J., HONGWU J., HOOVER N., CHONG A., IKONOMOU M. G., GOBAS FAPC. (2004).** Distribution of phthalates esters in a marine aquatic food web: comparison to polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Technology*, 38: 2011 - 2020.
- **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.
- **MARCHAL N. et BOURDON J.L. (1982).** Les milieux de cultures pour l’isolement et l’identification biochimique des bactéries. Ed Doin, Paris.
- **MCLEAN, J. S., BEVERIDGE, T. J. et PHIPPS, D. (2000).** Isolation and characterization of a chromium-reducing bacterium from a chromated copper arsenate-contaminated site. *Environmental Microbiology*, 6 (2) : 611-619.
- **MOORE J., KAVLOCK R., BOEKELHEIDE K., CHAPIN R., CUNNINGHAM M. et FAUSTMAN E. (2002).** NTP center for the evaluation of health risks to human

- reproduction : phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reproductive toxicology* 5450, 1-39
- **MULLINGAN, C. N., YONG, R. N., et GIBBS, B. F. (2001).** An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 1-2 (85) : 145-163.
 - **NAKAMIYA K., HASHIMOTO S., ITO H., EDMONDS J. S., YASUHARA A. et MORITA M. (2005).** Microbial treatment of bis (2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride with isolated bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99: 115-119.
 - **NIEBOER E. et JUSYS A. A. (1988).** Biologic chemistry of chromium. In : NRIAGU, J. O., NIEBOER, E. Eds. Chromium in the Natural and human environments. NY : Wiley (*Advances in Environmental Sciences and Technology* vol. 20, pp 21-81.
 - **O'HEANY J. M. (1986).** Summary of health effects of chromium. Health Studies Service, Special Studies and Services Branch, Ontario Ministry of Labour.
 - **OMS IPCS. (1988).** Environmental Health Criteria 61: Chromium. World Health Organization, International programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva
 - **OTTON J. K., DRISCOLI C. T. et IVERFELDT A. (1994).** Trace metals speciation and cycling. In: Moldan B, Cerry J (eds) Biogeo- chemistry of small catchments. J Wiley, New York.
 - **PETTINE M., CAMUSSO M., MARTINOTTI W., MARCHETTI R., PASSINO R., et QUEIRAZZA G. (1994).** Soluble and particulate metals in the Po River: factors affecting concentrations and partitioning. *The Science of the Total Environment.*, 3 (145): 243-265.
 - **PHILLIPS W.E., et KLOOS W.E. (1981).** Identification of Coagulase-Positive *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* Isolates from Veterinary Clinical Specimens. *Journal of clinical Microbiology.*, 14, 671.
 - **QUAN C. S., LIU Q., TIAN W. J., KIKUCHI J. et FAN S. D. (2005).** Biodegradation of an endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 702-710.
 - **RAI D., EARY L. E. et ZACHARA. J. M. (1989).** «Environmental Chemistry of Chromium», *Science of the Total Environment.*, 86:15-23.
 - **RAHMAN RNZA., GEOK L. P., BASRI M., et SALLEH A. B. (2005).** Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresource Technology*. 96 : 429-436.

- **RAMADE R., 2000.** Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international. Paris (France), 58-365
- **ROBERT M., et CHENU C. (1992).** Interactions between Soil Minerals and Microorganisms. In Stotzky G., Bollag J.-M., (Eds). *Soil Biochemistry*, pp. 307-404, Marcel Dekker, New York.
- **RUSTY D. (2014).** Environmental specimen banks as a resource for mercury and mercury isotope research in marine ecosystems, *Environmental. Science.: Processes Impacts.*,16 : 10 -27
- **SALUNKHE P. B., DHAKEPHALKAR P. K., et PAKNIKAR K. M. (1998).** Bioremediation of hexavalent chromium in soil microcosms. *Biotechnology Letters.*, 8 (20): 749-751.
- **SEDLAK D. L. et CHAN P. G. (1997).** Reduction of hexavalent chromium by ferrous iron. *Geochimica Cosmochimica Acta.*, 11 (61) : 2185-2192.
- **SCHADECK S., VANDERHEYDEN V. et KREIT F. (2007).** Pollution locale des sols en Région Wallone, Dossier scientifique réalisé dans le cadre de l'élaboration du Rapport analytique 2006-2007 sur l'état de l'environnement Wallon.
- **SCHMITZER J. L., SCHEUNERT I. et KORTE F. (1988).** Fate of bis(2-ethylhexyl) phthalate in laboratory and outdoor soil-plant systems, *J. Agri. Food Chem.*, 36:210-215.
- **SCHOLTZ N. (1994).** Bestimmung der biologischen abbaubarkeit von vestinol im modifizierten sturm test, ST-90/94 W, Huls, A.G. Marl Germany.
- **SHARPE R. M., FISHER J. S., MILLAR M. M., JOBLING S. et SUMPTER J. P. (1995).** Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environmental Health Perspect*, 103: 1136 - 1143.
- **STAPLES C. A., PETERSON D. R., PARKERTON T. F. et ADAMS W. J. (1997).** The environmental fate of phthalates esters: a literature review. *Chemosphere.*, 35: 667 - 749.
- **STASINAKIS A. S. (2012).** Review on the fate of emerging contaminants during sludge anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 121: 432-440.
- **SWAN S. H. (2008).** Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental Resource*, 108 (2) :177-184.
- **THOMAS A. O. et LESTER J. N. (1993)a.** Environ. Technol: The microbial remediation of former gaswork sites - A review. Vol. 14 : 1-24.

- **U.S. Department of Health and Human Services (USDHHS). (2003).** Second national report on human exposure to environmental chemicals. Centers for disease control and prevention, DHHS, 251 pp.
- **VAMSEE-KRISHNA C., MOHAN Y. et PHALE P. S. (2006).** Biodegradation of phthalate isomers by *Pseudomonas aeruginosa* PP4, *Pseudomonas* sp. PPD and *Acinetobacter lwoffii* ISP4. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (6) : 1263 – 1269.
- **VIALA A. et BOTTA A. (2005).** Toxicologie. 2em edition. Lavoisier.
- **VINAS M., GRIFOLL M. M., SABATE J., SOLANAS A. M. (2002).** Biodegradation of a crude oil by the microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 252-260.
- **VOGEL T., BALLERINI D. (2001).** Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull.Soc.Fr.Microbiol.*, 16 (3) : 204-209.
- **WANG JIANLONG., ZHAO XUAN et WU WEIZHONG. (2004).** Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge. *Process Biochemistry* 39 :1837–1841.
- **WANG JUN., ZHANG MAN-YUN., CHEN TING., ZHU YE., TENG YING., LUO YONG-MING. et PETER CHRISTIE (2015).** Isolation and Identification of a Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate-Degrading Bacterium and Its Role in the Bioremediation of a Contaminated Soil. *Pedosphere.*, 25(2): 202-211.
- **WANG Y. T. et SHEN H.** Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology*, 1995, vol. 14, pp 159-163.
- **WILLIAMS D.R.** Metals, ligands, and cancer. *Chem. Rev.*, 72: 203 (1972).
- **WOFFORD H.W., WILSEY C. D., NEFF G. S., GIAM C. S., NEFF J.M. (1981).** Bioaccumulation and metabolism of phthalate esters by oysters, brown shrimp and sheepshead minnows. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 5 : 202-210.
- **WORMUTH M.,** What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans Risk Anal. 2006 juin;26(3):803-824.
- **WEBBER M. D. et LESAGE S. (1989).** "Organic contaminants in Canadian municipal sludges", *Waste Manage. Res.*, 7: 63-82.
- **WU Q., LIU H., YE L. S., LI P. et WANG Y. H. (2013).** Biodegradation of Di-n-butyl phthalate esters by *Bacillus* sp.SASHJ under simulated shallow aquifer condition. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 76: 102-107.

- **XINHONG WANG., XING YUAN., ZHIGUANG HOU., JING MIAO., HUI ZHU. et CHUANTAO SONG. (2009).** Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on microbial biomass C and enzymatic activities in soil. *European Journal of Soil Biology*, 45 : 370-376.
- **XUEPING CHEN., SHISAN XU., TIANFENG TAN., SIN TING LEE., SHUK HAN CHENG., FRED WANG FAT LEE., STEVEN JING LIANG XU. et KIN CHUNG HO. (2014).** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11: 3156-3168.
- **YUAN S. Y., LIU C., LIAO C. S. et CHANG B. V. (2002).** Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments. *Chemosphere.*, 49 (10):1295-1299.
- **ZENG F., CUI K. Y., FU J. M., SHENG G. Y. et YANG H. F. (2002).** Biodegradability of di (2-ethylhexyl) phthalate by *Pseudomonas fluorescens* FS1. *Water Air Soil Poll.* 140: 297-305.
- **ZENGA FENG., KUNYAN CUI., XIANGDONG LI., JIAMO FU. et GUOYING SHENG. (2004).** Biodegradation kinetics of phthalate esters by *Pseudomonas fluorescences* FS1. *Process Biochemistry.*,9 (39) : 1125–1129
- **ZHOU Q H., WU Z B., CHENG S P., HE F. et FU G P. (2005).** Enzymatic activities in constructed wetlands and di-n-butyl phthalate (DBP) biodegradation. *Soil Biology and Biochemistry* 37:1454–145



Annexes

ANNEXE I**Composition des principaux milieux de culture utilisés**– **Milieu MSM**

FeCl ₃	0,01 g/l ;
CaCl ₂	0,1 g/l ;
KH ₂ PO ₄	1 g/l ;
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,1 g/l ;
KNO ₃	0,5 g/l ;
NaCl.....	1 g/l ;

Le pH du milieu est ajusté à 7, puis stérilisé à 120°C /20min.

– **Milieu LURIA et BERTANI (LB)**

Tryptone	10g/l ;
Extrait de levure	5g/l ;
Na Cl	10g /l ;
L'eau distillée.....	1l ;

pH ajusté à 7,5 ; stérilisation à 120 °C/15mn.

Pour le milieu gélosé LB, ajout de 15 g/l d'Agar.

– **Eau physiologique stérile**

Chlorure de sodium (Na Cl).....	8.5g/l ;
Eau distillée	1l ;

Ajustement du pH à 7 ;

Stérilisation à 120 °C/15mn.

ANNEXE II

Protocole de mesure de la granulométrie

Le premier prélèvement correspond au poids de l'argile et limon fins (après 3 minutes et 54 secondes de décantation à une température de 29°C et à une profondeur de 10 cm).

Le deuxième prélèvement correspond au poids de l'argile (après 8 heures de sédimentation à une profondeur qui dépend de la température de la suspension).

- Détermination du facteur de correction dû à l'héxamétaphosphate de sodium :
 - Agiter l'éprouvette contenant seulement la solution d'héxamétaphosphate de sodium et faire un prélèvement à la pipette robinson.
 - Mettre le volume prélevé dans une capsule tarée et faire sécher à l'étuve à 105°C.

- Détermination de la fraction supérieure à 0,05
 - Remettre en suspension les particules par agitation
 - Superposer deux tamis de mailles à 0,2 mm et 0,05 mm.
 - Récupérer le contenu de chaque tamis dans une capsule tarée à l'aide de jets de pissette et faire sécher à l'étuve à 105°C. Le tamis de maille égale à 0,2 mm contiendra les sables grossiers, le tamis de maille égale à 0,05 mm contiendra les sables fins.

- Détermination de la fraction inférieure à 0,05 mm (Limon grossier)
 - Ajuster au volume de 1000 ml de l'eau distillée la fraction inférieure à 0,05 mm récupérée après tamisage.
 - Agiter l'éprouvette et prélever rapidement cette fraction à la pipette de Robinson.
 - Récupérer le contenu de la pipette et sécher à l'étuve à 105°C.

En considérant que les prélèvements sont de 20 ml, que le poids de la prise d'essai est de 15 g et que le volume total de la suspension est de 1000 ml, ceci en tenant compte du facteur de correction 100/100-H, et par la différence avec le poids de la capsule vide, nous déterminons les poids suivants :

P : prise d'essai.

P1 : poids des argiles, limons fins et l'héxamétaphosphate de sodium.

P2 : poids des argiles et l'héxamétaphosphate de sodium.

P3 : poids d'héxamétaphosphate de sodium.

P4 : poids de sables fins.

P5 : poids de sables grossiers

P6 : poids d'argile, limons fins, limons grossiers et l'héxamétaphosphate de sodium.

U : volume de la pipette Robinson.

V : volume totale de la suspension soit 1000 ml

MO : pourcentage de la matière organique

H : humidité résiduelle

CaCO₃ : pourcentage de CaCO₃ de l'échantillon (si la décarbonatation n'a pas été réalisée, CaCO₃ = 0)

$$(P2 - P3) \cdot V \cdot 100$$

$$\% \text{ d'argile} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(P - ((P/100) \cdot (MO + H + CaCO_3))) \cdot U$$

$$(P1 - P2) \cdot V \cdot 100$$

$$\% \text{ de limons fins} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(P - ((P/100) \cdot (MO + H + CaCO_3))) \cdot U$$

$$(P6 - P1) \cdot V \cdot 100$$

$$\% \text{ de limons grossiers} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(P - ((P/100) \cdot (MO + H + CaCO_3))) \cdot U$$

$$P4 \cdot 100$$

$$\% \text{ de sables fins} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(P - ((P/100) \cdot (MO + H + CaCO_3)))$$

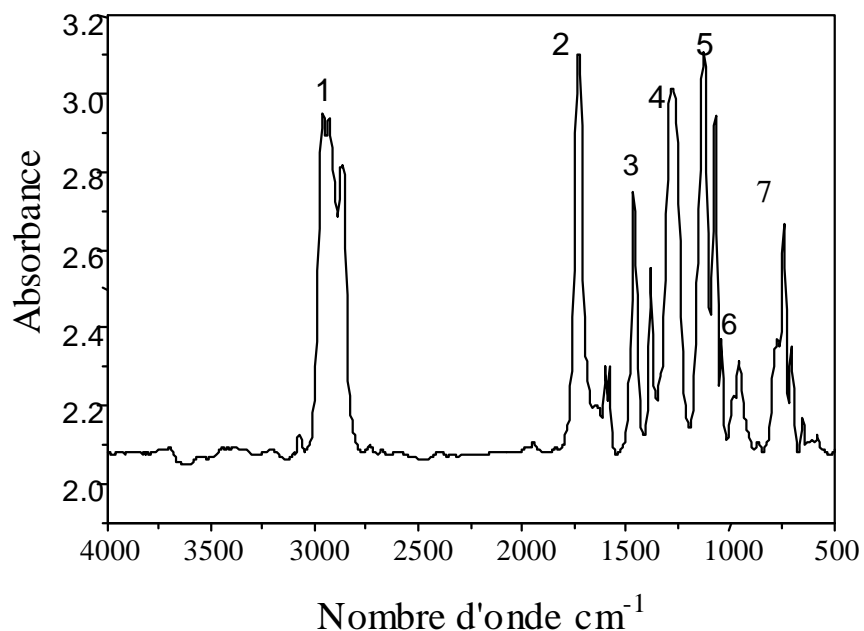
$$P5 \cdot 100$$

$$\% \text{ de sables grossiers} = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(P - ((P/100) \cdot (MO + H + CaCO_3)))$$

ANNEXE III

Spectre IR du DnOP et ses groupements fonctionnels

**Figure 1 :** Spectre IR du DnOP

Le tableau suivant énumère les différents Groupements fonctionnels caractéristiques du di-octyle phtalate (DOP).

Tableau I : Les groupements fonctionnels du di-octyle phtalate (DOP).

N°	Nombre d'onde (cm^{-1})	Mode de vibration et attribution
1	2937 – 2863	Elongation de C-H
2	1722	COO (ester)
3	1468 – 1384	Déformation –C-H (CH_3 , CH_2)
4	1271	Elongation –C-O
5	1121	Elongation –C-O
6	960	Déformation –CH=CH-
7	742	Déformation $(\text{CH}_2)_n$, $n > 4$

ANNEXE IV**Protocole de dosage du Cr VI (Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2006)****1. Préparation des solutions****• Solution extractive pour solide**

Pour préparer une solution de 1L, mettre 20g de NaOH et 30 g de Na₂CO₃ et ajuster à 1L avec l'eau distillée.

• Solution de diphényl-carbazide

Préparer une solution de 1,5-diphényl-carbazide 0,5% en mettant dans une fiole de 50 ml, 250 mg de 1,5-diphényl-carbazide dans environ de 45 ml d'acétone (96%) et compléter au trait de jauge avec de l'acétone.

2. Préparation des échantillons

- 1 g d'échantillon de sol mélangé avec 40 ml de la solution extractive ;
- Couvrir et mettre sous agitation en chauffant presque à ébullition pendant 60 mn ;
- Laisser refroidir et filtrer sur un filtre Whatman (Ø 41) ;
- Rincer le bécher et le filtré 3 fois avec l'eau distillée et recueillir dans un autre bécher ;
- Ajuster le pH du filtrat entre 7-8 avec l'acide nitrique (HNO₃) sous agitation.

3. Préparation de la solution étalon de Cr VI

- Pour une solution de 500 ml, dissoudre 1,8673 g de K₂CrO₄ puis ajuster avec de l'eau distillée.
- Dans une fiole jaugée de 100 ml, introduire à l'aide d'une pipette 10 ml de la solution étalon de Cr (VI) de 1000 mg/l et compléter jusqu'au trait de jauge avec l'eau distillée.
- Pour préparer une série de solutions étalons de 0,20, 0,50, 0,80 et 1,00 mg/l de Cr VI à partir de la solution étalon de Cr VI de 100 mg/l comme le résume le tableau suivant.

Tableau II : Préparation des solutions d'étalonnage à différentes concentrations du Cr VI

Concentration solution étalon (mg/l)	Volume de la solution de 100 mg/l (ml)	Volume final (ml)
0,20	0,2	100
0,50	0,5	100
0,80	0,8	100
1,00	1,0	100

4. Dosage

- Dans des tubes de 10 ml, mettre 5ml d'échantillon ,4 ml d'H₂SO₄ (2N), 0,20ml de diphényl-carbazide et 0,80ml d'eau distillée.

Note : Si l'échantillon est coloré, préparer un témoin d'échantillon en ajoutant, dans un tube, tous les réactifs sauf la solution de diphényl-carbazide.

- Homogénéiser les tubes ;
- Attendre entre 5 et 10 minutes pour le développement de la couleur ;
- Mesurer la DO des solutions une longueur d'onde de 540 nm.

5. Calcul et expression des résultats

- Tracer une courbe d'étalonnage à partir des mesures de DO et de la concentration des solutions étalons et déterminer la concentration de Cr VI dans l'échantillon à l'aide de cette courbe.

La concentration de chrome hexavalent dans les solides, exprimés en mg/kg, est déterminée comme suit :

$$C = \frac{(A-B)*V*F}{Ps}$$

;

C : concentration de chrome (VI) dans l'échantillon exprimée sur base sèche (mg/kg) ;

A : concentration de chrome (VI) dans la solution dosée (mg/l) ;

B : concentration lue de l'échantillon témoin, si nécessaire (mg/l)

F : facteur de dilution, si nécessaire ;

Ps : poids de l'échantillon (g) ;

V : volume final (ml).

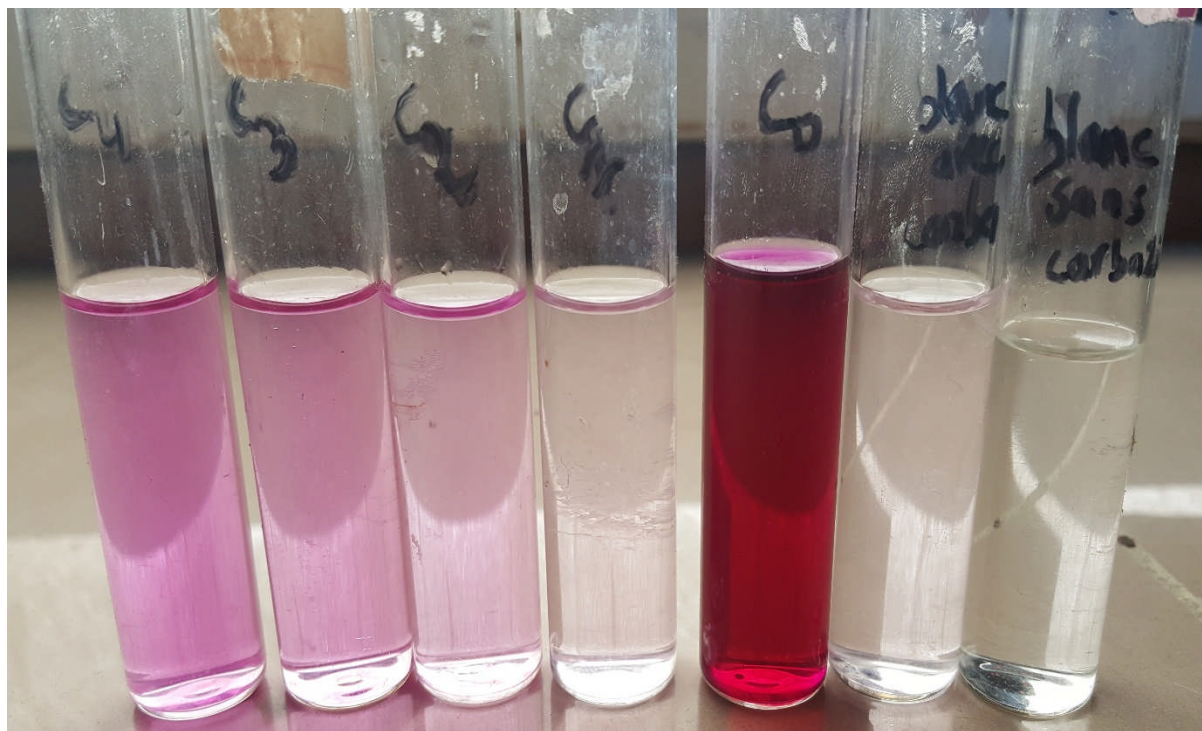
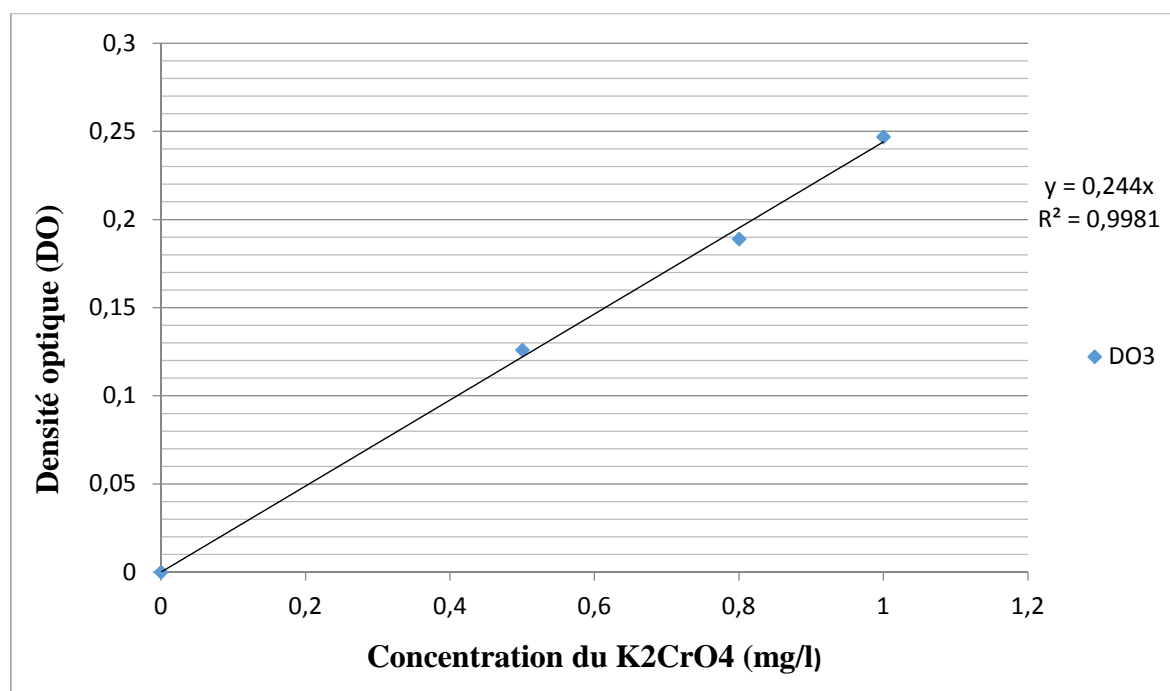


Figure 1 : Solutions étalon à différente concentration de Cr (VI)

ANNEXE V

Figure 1 : Courbe d'étalonnage du chrome ($K_2Cr_2O_4$)

ANNEXE VI : Résultats des tests statistiques

Tests Univariés de Significativité pour polluant (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse					
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2410,812	1	2410,812	135,2771	0,000312
Echantillons	314,361	1	314,361	17,6396	0,013696
Erreur	71,285	4	17,821		

Test de Newman-Keuls ; variable polluant (Feuille de données1) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = 17,821, dl = 4,0000				
Cellule N°	Echantillons	taux de dégradation des phtalates Moyenne	1	2
1	Sol stérile	12,80667	****	
2	Sol non stérile	27,28333		****

Figure 1 : Tables de l'ANOVA et Newman-Keuls pour les résultats du taux de dégradation Du DnOP pour les échantillons de sol stérile et non stérile non inoculés.

		Test t pour des Echantillons Indépendants (Feuille de données1) Note : Variables traitées comme des échantillons indépendants								
Groupe1 vs. Groupe2		Moyenne Groupe 1	Moyenne Groupe 2	valeur t	dl	p	N Actifs Groupe 1	N Actifs Groupe 2	Ec-Type Groupe 1	Ec-Type Groupe 2
taux de deg. vs. Echantillons		17,50000	101,5000	-8,82988	2	0,012584	2	2	13,43503	0,707107

		Test U de Mann-Whitney (Feuille de données1) Par var. Echantillons Tests significatifs marqués à $p < 0,05000$							
variable	SommeRgs SNS+ph+Cr	SommeRgs Sol st +ph+Cr	U	Z	niv. p	Z ajusté	niv. p	N Actif SNS+ph+Cr	N Actif Sol st +ph+Cr
taux de deg.			0,00	0,00	1,000000	0,00	1,000000	1	1

Figure 2 : Table de Student et son test complémentaire de Mann-Whitney pour les résultats du taux de réduction du Cr VI dans les échantillons de sol pollué et non inoculé.

		Tests Univariés de Significativité pour pH (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	229,5225	1	229,5225	13004,11	0,000077	
Echantillons	0,0016	1	0,0016	0,09	0,791768	
Erreur	0,0353	2	0,0177			

Figure 3 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par le DnOP et non inoculé.

		Tests Univariés de Significativité pour pH (Feuille de données) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
Effet	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p	
ord. origine	270,6025	1	270,6025	6256,705	0,000160	
Echantillons	0,0576	1	0,0576	1,332	0,367764	
Erreur	0,0865	2	0,0432			

Figure 4 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par le DnOP + Cr VI et non inoculé.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour pH (Feuille de données) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	296,5284	1	296,5284	296528,4	0,000003
Echantillons	0,0004	1	0,0004	0,4	0,591752
Erreur	0,0020	2	0,0010		

Figure 5 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par le Cr VI et non inoculé.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour pH (pht(ph)) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1170,941	1	1170,941	68336,21	0,000000
Echantillons	0,445	11	0,040	2,36	0,093314
Erreur	0,171	10	0,017		

Figure 6 : Tables de l'ANOVA pour les résultats de l'évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par Le DnOP.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour pH (pht(ph)) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1405,664	1	1405,664	71263,07	0,000000
Echantillons	2,797	11	0,254	12,89	0,000174
Erreur	0,197	10	0,020		

Cellule N°	Test de Newman-Keuls ; variable pH (pht(ph)) Groupes Homogènes, alpha = ,05000 Erreur : MC Inter = ,01973, dl = 10,000			
	Echantillons	pH Moyenne	1	2
11	SNS (temoin)	7,200000		****
12	Sol st+pht+Cr (temoin)	8,115000	****	
8	SNS+ph+Cr+ <i>B.cereus</i>	8,155000	****	
6	SNS+ph+Cr (temoin)	8,290000	****	
10	SNS+ph+Cr+ <i>B.cereus</i> + <i>S.aureus</i>	8,290000	****	
7	SNS+ph+Cr+ <i>P.aeruginosa</i>	8,375000	****	
4	ST+ph+Cr+ <i>S.aureus</i>	8,390000	****	
5	ST+ph+Cr+ <i>B.cereus</i> + <i>S.aureus</i>	8,420000	****	
9	SNS+ph+Cr+ <i>S.aureus</i>	8,455000	****	
3	ST+ph+ <i>S.aureus</i>	8,470000	****	
2	ST+ph+ <i>B.cereus</i>	8,485000	****	
1	ST+ph+ <i>P.aeruginosa</i>	8,550000	****	

Figure 7 : Tables de l'ANOVA et Newman-Keuls des résultats de l'évolution du pH dans les échantillons de sol pollué par les DnOP + Cr VI.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour Taux de dégradation pht (Feuille deg pht) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	26909,56	1	26909,56	225,5793	0,000000
Echantillons	2430,61	10	243,06	2,0375	0,149528
Erreur	1073,62	9	119,29		

Figure 8 : Table de l'ANOVA pour les résultats du taux de dégradation du DnOP pour les échantillons pollués par le DnOP et le (DnOP + Cr VI) selon le type de l'inoculum.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour deg (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	19990,00	1	19990,00	160,0785	0,000225
souches	440,34	3	146,78	1,1754	0,423632
Erreur	499,51	4	124,88		

Figure 9 : Table de l'ANOVA pour les résultats du taux de réduction du Cr VI pour les échantillons pollués par le DnOP + Cr VI selon le type de l'inoculum.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour taux (Feuille de données6) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	40138,12	1	40138,12	77,17370	0,000000
Taux de dégradation	348,01	1	348,01	0,66912	0,427063
Erreur	7281,41	14	520,10		

Figure 10 : Table de l'ANOVA pour les résultats du taux de dégradation Du DnOP pour tous les échantillons de sol (effet de la présence d'un autre polluant).

Effet	Tests Univariés de Significativité pour dosage (Feuille de données1) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1,440056	1	1,440056	181,2657	0,000000
jours	0,009667	4	0,002417	0,3042	0,873439
Erreur	0,317778	40	0,007944		

Figure 11 : Table de l'ANOVA pour les résultats de l'analyse de l'activité de la catalase en fonction du temps.

ANNEXE VII

Courbe d'étalonnage de la masse de la matière sèche des souches bactériennes utilisées en fonction de la densité optique (DO).

